



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO HIDROLISADO DA BIOMASSA
CACAUEIRA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

RAYANE GRIZOTTI KIEFER

ALEGRE, ES

2018

Rayane Grizotti Kiefer

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO HIDROLISADO DA BIOMASSA
CACAUEIRA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química.

Linha de Pesquisa: Modelagem, Otimização e Análise de Processos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Iara Rebouças Pinheiro.

ALEGRE, ES

Agosto de 2018

K47e Kiefer, Rayane Grizotti, 1991-
Estudo da fermentação alcoólica do hidrolisado da biomassa
cacaueira para produção de etanol / Rayane Grizotti Kiefer. – 2018.
71 f. : il.

Orientador: Iara Rebouças Pinheiro.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Cacau. 2. Biocombustíveis. 3. Álcool. 4. Hidrólise. 5.
Fermentação. I. Pinheiro, Iara Rebouças. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 66.0

Rayane Grizotti Kiefer

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO HIDROLISADO DA BIOMASSA
CACAUEIRA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Engenharia
Química do Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias da Universidade Federal do
Espírito Santo, como parte das exigências
para obtenção do Título de Mestre em
Engenharia Química.

Examinado em 31 de agosto de 2018.

Jara Rebouças Pinheiro

Prof.^a Dr.^a Jara Rebouças Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo

Damaris Guimarães

Prof.^a Dr.^a Damaris Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo

Lilian Gasparelli Carreira

Prof.^a Dr.^a Lilian Gasparelli Carreira
Universidade Federal do Espírito Santo

Jussara Moreira Coelho

Prof.^a Dr.^a Jussara Moreira Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo

DEDICATÓRIA

À todas as mulheres.
Especialmente às que se dedicam à ciência.
Marielle presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Claudio e Rosangela, e à minha irmã, Christiane por todo amor, investimento e apoio. Sem vocês nada seria possível.

Ao meu parceiro de todas as horas, Zé Laurindo, pela companhia, apoio e amor. Obrigada por me mostrar sempre que existe uma saída.

À minha orientadora, Professora Doutora Iara Rebouças Pinheiro, por ter aceitado me guiar nessa jornada chamada Mestrado. Pela disponibilidade, paciência, incentivo, confiança, compreensão e ensinamentos. Especialmente pela empatia transmitida.

Às professoras, Prof.^a Dr.^a Lilian Gasparelli Carreira, Prof.^a Dr.^a Damaris Guimarães e Prof.^a Dr.^a Jussara Moreira Coelho por aceitarem o convite de integrarem a banca examinadora.

Aos professores e funcionários do Curso de Engenharia Química da UFES, em especial aos técnicos de laboratório Flaviane Ambrozim e Pedro Fonseca pelo auxílio, paciência e incentivo durante todos os momentos de dificuldade.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química Mariana, Antônio e Livia pela simpatia e boa vontade em ajudar a solucionar inúmeros problemas burocráticos.

Aos amigos que Alegre me deu por todos os momentos de descontração e companheirismo: Thaís, Flaviane, Rhynara, Ana Júlia, Rhuany, Talita, Gustavo, Bárbara, Rafael, Pedro, Renan, Iauani, Giselle, Patrícia, Ariane, Mônica, Amanda, Géssica e quem mais eu tiver esquecido de citar.

Aos laboratórios de Microbiologia do curso de Engenharia de Alimentos, de Química do curso de Química e de Microbiologia do curso de Farmácia pela contribuição na parte experimental do trabalho.

À agroindústria Chocolates Espírito Santo pela doação da matéria-prima para a realização dos experimentos.

À FAPES e à CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

KIEFER, Rayane Grizotti. Estudo da fermentação alcoólica do hidrolisado da biomassa cacaueira para produção de etanol. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientador: Prof.^a. Dr.^a Iara Rebouças Pinheiro.

Dentre os resíduos gerados pelas agroindústrias, destacam-se os compostos por materiais lignocelulósicos que podem ser transformados em produtos de valor agregado. Com o intuito de estudar formas de minimizar resíduos e reutilizá-los para produção de energia a partir de fontes renováveis, trabalhou-se com resíduos da agroindústria cacaueira a fim de produzir bioetanol por meio da fermentação alcoólica em diferentes concentrações iniciais de células e suplementação de glicose. Para tanto, realizou-se etapa de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (7,355% v/v) a fim de facilitar a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares, bem como hidrólise com ácido sulfúrico diluído (0,5% m/v). No decorrer dos ensaios fermentativos sob agitação a 30 °C, com *S. cerevisiae*, acompanhou-se a cinética de crescimento celular e a concentração de ART presente no meio, bem como a concentração de etanol em 24 e 48 horas do processo. Os maiores teores de etanol encontrados referem-se aos ensaios que apresentaram maiores valores de velocidade específica máxima (cerca de 0,145 a 0,167 h⁻¹), tendo esses iniciado o cultivo com concentração celular de 0,80 e 1,00 g/L, atingindo teor de etanol de 5,8 e 4,3 °GL em 48 horas, respectivamente. Tais resultados apontam a viabilidade da utilização do hidrolisado proveniente da biomassa do cacau para a produção de bioetanol.

Palavras-chave: cacau, biocombustíveis, álcool, hidrólise, fermentação.

ABSTRACT

KIEFER, Rayane Grizotti. Study of the alcoholic fermentation of the cocoa biomass hydrolyzate for the production of ethanol. 2018. Dissertation. (Master degree in Chemical Engineering) - Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Adviser: Prof.^a. Dr.^a Iara Rebouças Pinheiro.

Among the residues generated by the agroindustries, it is highlighted those composed of lignocellulosic materials that can be transformed into valuable products. In order to study ways of minimizing waste and reusing them for energy production from renewable sources, it was worked with cocoa agroindustry residues to produce bioethanol through alcoholic fermentation at different initial concentrations of cells and supplementation of glucose. For this reason, an alkaline hydrogen peroxide pretreatment step (7.355% v/v) was carried out in order to facilitate the conversion of the cellulose and hemicellulose into sugars, as well as to hydrolyze with dilute sulfuric acid (0.5% w/v). During the fermentation tests under agitation at 30 °C, with *S. cerevisiae*, the cell growth kinetics and the ART concentration, also the ethanol concentration was observed in 24 and 48 hours of the process. The highest ethanol levels were the ones that presented the uppermost maximum specific speed of cell growth. The highest levels of ethanol were found in the trials that presented the highest maximum specific velocity values (about 0.145 to 0.167 h⁻¹), which were started with cell concentration of 0.80 and 1.00 g/L, reaching ethanol content of 5,8 and 4,3 °GL in 48 hours, respectively. These results indicate the feasibility of the use of hydrolysate from cocoa biomass for bioethanol production.

Keywords: cocoa, biofuels, alcohol, hydrolysis, fermentation.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Construção da curva de calibração para determinação de ART pelo método DNS.	60
Apêndice B - Construção da curva de calibração para determinação de concentração celular.	62
Apêndice C - Construção de curva de calibração para determinação de etanol pelo método do dicromato de potássio.	63
Apêndice D - Tabelas dos resultados de ART e concentração celular dos ensaios fermentativos.	65
Apêndice E - Velocidade específica máxima.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de molécula de celulose.	19
Figura 2 - Estrutura dos monossacarídeos que formam hemicelulose.	20
Figura 3 - Exemplo de estrutura de hemicelulose, representada pela xilana. .	21
Figura 4 - Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico.	22
Figura 5 - Exemplo de fragmento de lignina.	23
Figura 6 - Formação dos principais componentes inibitórios ao processo fermentativo.	31
Figura 7 - Fluxograma das etapas de preparação e pré-tratamento da casca de cacau <i>in natura</i>	32
Figura 8 - Sistema montado para destilação.	38
Figura 9 - Curvas de concentração celular (g/L) em função do tempo nos ensaios 1, 3 e 4, que X é a concentração celular inicial.	43
Figura 10 - Curvas de concentração de ART (g/L) em função do tempo nos ensaios 1, 3 e 4, que X é a concentração celular inicial.	45
Figura 11 - Curvas de concentração celular (g/L) em função do tempo nos ensaios 3, 5 e 6, em que G é a concentração de glicose suplementada.	46
Figura 12 - Curvas de concentração de ART (g/L) em função do tempo nos ensaios 3, 5 e 6, em que G é a concentração de glicose suplementada.	47
Figura 13 - Curva de concentração celular X (g/L) e consumo de ART em função do tempo para o ensaio 3.	49
Figura 14 - Curva de concentração celular X (g/L) e consumo de ART em função do tempo para meio fermentativo composto apenas por glicose.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores aproximados de algumas características físicas do cacau.	18
Tabela 2 - Principais diferenças entre celulose e hemicelulose.	21
Tabela 3 - Composição química e bromatológica da casca do cacau, seca a 105 °C.	24
Tabela 4 - Comparação de caracterizações de casca de cacau e bagaços de cana-de-açúcar de diferentes autores.	24
Tabela 5 - Resumo das condições experimentais realizadas.	36
Tabela 6 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios fermentativos.	40
Tabela 7 - Comparação entre teores de etanol proveniente da fermentação de diferentes biomassas lignocelulósicas.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Motivações.....	13
1.2 Objetivo geral.....	15
1.3 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Cacau	16
2.1.1 Processamento do cacau	17
2.1.2 Resíduos gerados no processamento	18
2.2 Materiais lignocelulósicos	18
2.2.1 Celulose	19
2.2.2 Hemicelulose	20
2.2.3 Lignina	22
2.2.4 Material proveniente da indústria cacaueira	23
2.3 Biocombustíveis.....	25
2.3.1 Bioetanol	25
2.4 Produção de bioetanol	26
2.4.1 Pré-tratamento da biomassa cacaueira	26
2.4.2 Hidrólise	27
2.4.3 Fermentação	28
2.4.3.1 Principais inibidores	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Matéria-prima e pré-tratamento	32
3.1.1 Biomassa	32
3.1.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino	33
3.2 Hidrólise ácida	33
3.3 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART).....	34
3.3.1 Solução DNS	34
3.3.2 Quantificação dos açúcares redutores totais	35
3.4 Fermentação.....	35
3.4.1 Preparação do inóculo.....	36
3.4.2 Concentração celular	36
3.4.3 Ensaio fermentativos	37

3.5 Destilação	38
3.5.1 Determinação do teor alcoólico	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Ensaios Fermentativos	40
4.2 Influência da concentração celular	43
4.3 Influência da suplementação de glicose	45
4.4 Influência da presença de inibidores.....	48
5 CONCLUSÃO.....	51
6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8 APÊNDICES.....	60
___APÊNDICE A - Construção da curva de calibração para determinação de ART pelo método DNS.	60
___APÊNDICE B - Construção da curva de calibração para determinação de concentração celular.	62
___APÊNDICE C - Construção de curva de calibração para determinação de etanol pelo método do dicromato de potássio.....	63
___APÊNDICE D - Tabelas dos resultados de ART e concentração celular dos ensaios fermentativos.	65
___APÊNDICE E - Velocidade específica máxima.	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivações

Desde que o homem passou a viver em sociedade, estabelecendo residência fixa, o crescimento populacional passou a ser exponencial. O século passado foi marcado por um avanço científico e tecnológico sem precedentes que, simultaneamente, resultou em consequências irreparáveis ao meio ambiente. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2017), estima-se que a população mundial crescerá em 28% até 2050 e deverá utilizar 71% a mais de recursos por pessoa, o que significa que o uso global de metais, biomassa, minerais e outros materiais subirá de 85 bilhões para 186 bilhões de toneladas/ano. Tal fato torna imprescindível preservar a natureza, visando diminuir os impactos causados pelo avanço da sociedade e garantindo a não deterioração acelerada do meio ambiente.

Desse modo, a matriz energética mundial necessita, urgentemente, ser diversificada, a fim de minimizar os danos causados ao meio ambiente e diminuir a dependência de combustíveis fósseis, bem como estudar formas de minimizar resíduos e reutilizá-los para produção de energia a partir de fontes renováveis (OLIVEIRA, 2006).

Segundo Dantas e Aquino (2010), os resíduos agroindustriais resultam principalmente das atividades de processamento de frutas, carnes, celulose e papel, usinas sucroalcooleiras, entre outras. Tais resíduos, ou biomassas, possuem bioenergia que pode ser processada a fim de serem obtidos produtos de valor agregado, como biogás, fertilizantes, enzimas e etanol de segunda geração (BNDS e CGEE, 2008). Portanto, descartar de modo incorreto resíduos agrícolas é desperdiçar fontes de energia e nutrientes importantes (OLIVEIRA, 2006).

Dentre os produtos do processamento da biomassa, destaca-se o estudo da produção do bioetanol, ou etanol de segunda geração, que surge a fim de transformar resíduos lignocelulósicos de grande disponibilidade em biocombustível sustentável. Um exemplo é o bagaço de cana-de-açúcar, rico em celulose, que pode ser convertido em açúcar e transformado em bioetanol no processo fermentativo (BNDS e CGEE, 2008).

Particularmente, na agroindústria, destacam-se àqueles gerados pela cacaueteira que, segundo Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC (2018) é principalmente composto pela casca do cacau, correspondendo a 80% da

composição do fruto. Estima-se que a safra de 2017 deva ter atingido a produção de 274 mil toneladas de amêndoas, 28% a mais que a safra de 2016, o que significa que 2.192.000 toneladas de casca de cacau fresca foi descartada. Destaca-se que o Espírito Santo é o 4º no ranking de produção brasileira de cacau (IBGE, 2017).

Segundo Silva (2018), a grande quantidade de resíduo gerado após extração da amêndoa, bem como, a celulose (20 a 50%) e a hemicelulose (20 a 30%) presentes em sua composição torna este material atrativo para aplicação na produção de bioetanol, uma vez que podem ser transformados em açúcares fermentescíveis. Todavia, para a utilização de resíduo cacaueiro faz-se necessária a realização de duas etapas preliminares à fermentação alcoólica: pré-tratamento da biomassa, a fim de minimizar a interação entre os constituintes do vegetal, e hidrólise, com o intuito de converter os carboidratos disponíveis em açúcares fermentescíveis.

O hidrolisado de casca de cacau segue para processo de fermentação alcoólica, em que micro-organismos metabolizam os açúcares e os transformam em etanol e dióxido de carbono (LIMA *et al.*, 2001). Apesar de tal modelo de produção de etanol ser amplamente estudado proporcionando informações essenciais ao desenvolvimento do processo, conforme revisões de Sun e Cheng (2002) e Sarkar *et al.* (2012), relatando promissores resultados à utilização de material lignocelulósico, são escassos os estudos em que a casca de cacau é estudada.

Assim, o presente trabalho estudou a produção de bioetanol a partir de biomassa cacaueira por se tratar de promissora matéria-prima lignocelulósica ainda pouco estudada, avaliando a influência da concentração celular inicial e da suplementação de glicose.

1.2 Objetivo geral

Produzir etanol a partir de biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos da indústria cacaueteira.

1.3 Objetivos específicos

- Obter hidrolisado de biomassa da agroindústria cacaueteira;
- Estudar a fermentação alcoólica utilizando meio hidrolisado, em diferentes suplementações de glicose, bem como, variando as concentrações iniciais de inóculo;
- Avaliar o potencial de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica proveniente de agroindústria cacaueteira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cacau

O fruto, cacau, é proveniente da espécie arbórea popularmente conhecida como cacaueiro, denominada cientificamente por *Theobroma cacao* L. Trata-se de uma espécie nativa das regiões tropicais das Américas Central e do Sul. Tal espécie possui expectativa de vida de mais de cem anos, podendo atingir de 4 a 8 m de altura, produzindo frutos que medem até 25 cm de comprimento. Do cacau são extraídas as sementes, que após o processo fermentativo, obtém-se amêndoas utilizadas na produção de manteiga de cacau e cacau em pó (CEPLAC, 2018).

O cacau tornou-se mundialmente conhecido após ser levado da América para a Europa a partir de 1520, e a primeira fábrica de chocolates nasceu na França, em 1659. Só em 1746, que a agroindústria cacaueira iniciou sua produção no Brasil, consolidando o cultivo de cacau em cidades do sul da Bahia, em 1752. O cacaueiro se adaptou de modo tão significativo às condições oferecidas na região do sul do estado baiano que a cultura cacaueira se espalhou pelo recôncavo baiano, até o norte do Espírito Santo, fazendo com que essa região ficasse conhecida como “Região Cacaueira” (CUENCA e NAZARIO, 2004; ABICAB, 2018).

Apesar de as safras temporãs, que compreendem o período de maio a setembro, de 2017 (36.876 toneladas de cacau) apresentarem redução na produção devido à estiagem que afetou lavouras de cacau desde setembro de 2015 (94.836 toneladas). Somado ao fato de a produção brasileira representar apenas 4% da produção de cacau mundial, planos para a formação de uma coalisão a fim de aumentar a produção de cacau no Brasil estão em vigor, uma vez que a atual projeção de produção não atende sequer à demanda interna (BITTENCOURT, 2017; AIPC, 2018).

Existem, ainda, projetos de incentivo público, em que se cita o projeto PLC 7/2017, que visa aumentar a qualidade do cacau brasileiro por meio de estímulo à produção, industrialização e comercialização do produto. Dentre as diretrizes do projeto estão o desenvolvimento tecnológico da cultura cacaueira, bem como a colaboração entre setores público e privado por meio de parcerias que apoiem o comércio interno e externo, estimule a pesquisa e ofereça linhas de crédito voltadas a produção de cacau de qualidade (BRASIL, 2018).

No Brasil, a produção cacaueteira movimenta cerca de R\$ 14 bilhões anualmente, destacando-se os estados de Rondônia, Bahia, Pará e Espírito Santo como os maiores produtores no Brasil, num total de 745 mil hectares de área plantada. Ressalta-se que o cacau é um dos oito produtos agrícolas que apresentaram aumento de faturamento em 2018, com uma taxa de 8% (GOMES, 2018). Em especial na região amazônica, graças a um trabalho científico iniciado a mais de 50 anos em que foram feitos cruzamentos entre pólenes de cacaueteiros selecionados de modo a obter sementes mais resistentes e mais produtivas. (MERCADO DO CACAU, 2017)

O Espírito Santo é o 4º no ranking de produção brasileira de cacau, em que 90% é proveniente da cidade de Linhares que foi destaque em premiação internacional. A amêndoa de produtor local ficou em 18º dentre as 50 melhores do mundo (IBGE, 2017; CAMPO VIVO, 2018).

2.1.1 Processamento do cacau

O processamento do cacau é iniciado na plantação por meio da colheita, subdividindo-se ainda em quebra, fermentação e secagem. Após o quinto dia de colheita, ocorre a quebra dos frutos e as sementes são removidas da polpa. Em seguida, as sementes são limpas e classificadas de acordo com forma, germinação e dia de quebra, para que então sejam fermentadas de forma natural e submetidas à secagem (BISPO *et al.*, 2005; OLIVEIRA Jr. e COSTA, 2003).

O principal objetivo da etapa fermentativa é evitar que ocorra germinação da semente. Salienta-se que durante a fermentação da amêndoa ocorre aumento de temperatura, mudança de pH e redução de açúcares. Por outro lado, a etapa de secagem garante a preservação de características físico-químicas, sensoriais e qualitativas do aroma e sabor de um bom chocolate (BISPO *et al.*, 2005; OLIVEIRA Jr. e COSTA, 2003).

2.1.2 Resíduos gerados no processamento

Na maioria dos processos agrícolas, o foco é minimizar resíduos e maximizar lucros, tornando-se essencial estudar novas tecnologias que utilizem os resíduos gerados. Em se tratando da indústria cacaueteira, a maior parte dos resíduos são constituídos de casca, como pode ser observado na Tabela 1, uma vez que apenas as amêndoas são comercializadas em grande escala. Destaca-se que a casca não é normalmente utilizada com o intuito de adubar o cacaueteiro por poder apresentar fontes de patógenos, como a murcha-de-Verticillium, o cancro-de-Lasiodiplodia, dentre outros (SILVA NETO *et al.*, 2001; HART, 2017; MORORÓ, 2012; OLIVEIRA e LUZ, 2005).

Todavia, a casca de cacau pode ser empregada de forma sustentável o que contribui para a conservação do meio ambiente, ao mesmo tempo que maximiza os lucros do produtor agrícola. Algumas alternativas de aproveitamento que podem ser citadas são: a alimentação animal de modo controlado; a produção de adubo, de celulose, de extrato concentrado de potássio, de biogás e biofertilizante; a produção de bioetanol; dentre outros (MORORÓ, 2012; HART, 2017).

Tabela 1 - Valores aproximados de algumas características físicas do cacau.

Componente	Peso (g)	% em relação ao peso do fruto
Fruto	500	100
Casca	400	80
Sementes frescas	100	20
Semente seca (amêndoa)	50	10
Nibs (cotilédones limpos)	40	8

Fonte: Mororó, 2012.

2.2 Materiais lignocelulósicos

Toda matéria orgânica proveniente de espécies vegetais, bem como, seus resíduos gerados, são materiais lignocelulósicos, uma vez que o principal constituinte das plantas se trata de material fibroso denominado lignocelulose. A estrutura da lignocelulose consiste de uma complexa formação composta por celulose, hemicelulose e lignina. Segundo Malherbe e Cloete (2002), as propriedades

químicas dos componentes que formam a lignocelulose lhe atribuem grande valor biotecnológico graças a quantidade de carboidrato disponível.

Segundo Jeffries e Jin (2000), visto que a biomassa lignocelulósica pode ser oriunda de diversas espécies vegetais diferentes, idade, tempo de colheita, condição ou estágio do crescimento vegetal, a proporção de celulose, hemicelulose e lignina pode variar consideravelmente. Em média, a biomassa lignocelulósica é composta por, aproximadamente, de 20 a 50% de celulose, de 20 a 30% de hemicelulose, de 15 a 30% de lignina e de 5 a 20% de outros componentes (pectina, proteína e extrativos), ou seja, mais de 70% de massa seca constituída por carboidratos que podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos, evidenciando que esta biomassa é uma promissora matéria-prima para a produção de bioetanol (RABELO, 2007; TAMANINI e HAULY, 2004).

Materiais lignocelulósicos têm sido objeto de estudo de vários trabalhos como fonte para obtenção de açúcares fermentáveis e produção de etanol. Como o proposto por Aguiar (2010), em que resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e palha de trigo foram pré-tratados e avaliou-se a produção de celulase por meio da hidrólise enzimática. Enquanto Silva (2010) propõe a produção de bioetanol utilizando biomassa residual da indústria de celulose, Santos *et al.* (2012) avalia o potencial de produção de etanol a partir da palha da cana-de-açúcar. Ademais cita-se Bansal *et al.* (2013) que avaliou o potencial de produção de bioetanol ao utilizar como biomassa resíduos agrícolas oriundos do estado do Tennessee, nos Estados Unidos.

2.2.1 Celulose

Trata-se de um polissacarídeo linear constituído exclusivamente por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β 1,4, como pode ser observado na Figura 1. A molécula de celulose possui estrutura ordenada, rígida e inflexível (celulose cristalina) e regiões de estruturas flexíveis compactas (celulose amorfa). É insolúvel em água e possui alta massa molar. Uma molécula de celulose pode possuir de 1.000 a 15.000 unidades de glicose, sendo este o principal componente da lignocelulose (SARKAR *et al.*, 2012; OGEDA e PETRI, 2010; MOHAN, PITTMAN e STEELE, 2006).

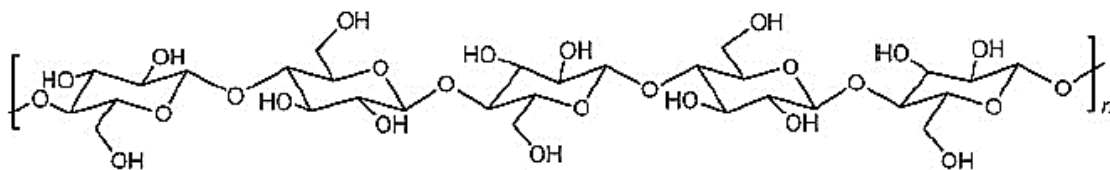


Figura 1 - Representação esquemática de molécula de celulose. Fonte: Santos *et al.* (2012).

2.2.2 Hemicelulose

O termo hemicelulose é utilizado coletivamente para denominar grupos distintos de polissacarídeos constituídos por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose) e ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, como pode ser observado na Figura 2. Trata-se do segundo componente em maior quantidade na lignocelulose, é curto e altamente ramificado, realiza a ligação entre as fibras da celulose e da lignina, o que confere rigidez e integração das moléculas que compõem a parede celular (OGEDA e PETRI, 2010; COLLINS, GERDAY E FELLER, 2005).

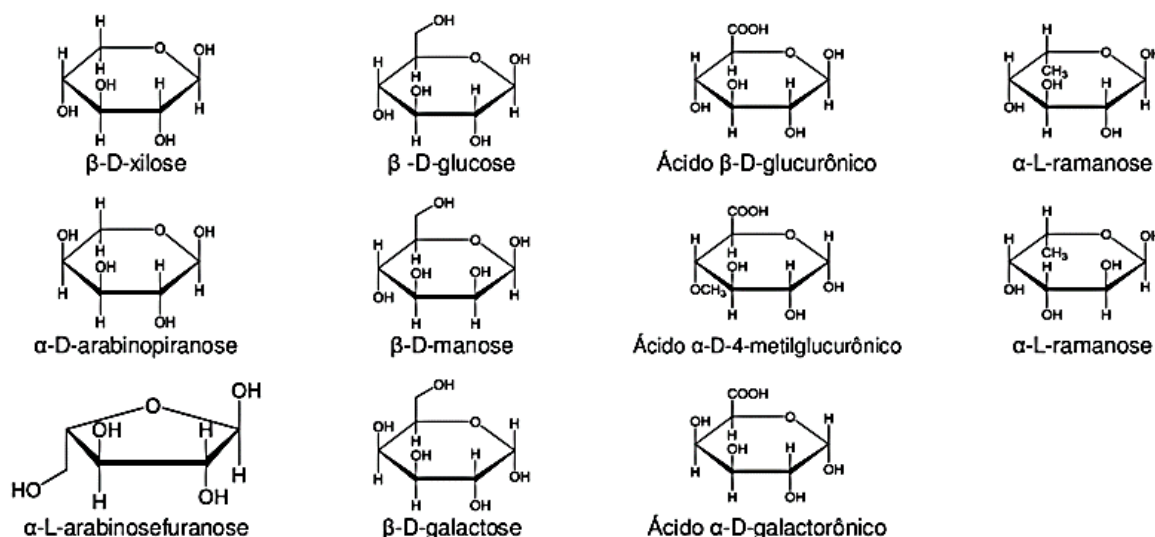


Figura 2 - Estrutura dos monossacarídeos que formam hemicelulose. Fonte: Fengel e Wegener (1989), adaptado pelo autor.

Hemiceluloses são geralmente categorizadas em relação ao resíduo de açúcar principal de sua estrutura, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas. São

classificadas, ainda, dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos, originando várias outras subclasses de hemiceluloses. Portanto, a composição química e as características estruturais das hemiceluloses variam amplamente (OGEDA e PETRI, 2010). Na Figura 3 está apresentado um exemplo de hemicelulose, a xilana.

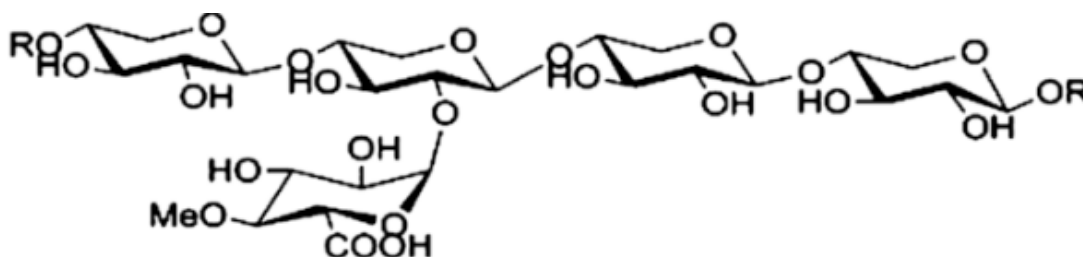


Figura 3 - Exemplo de estrutura de hemicelulose, representada pela xilana. Fonte: Xu, Li e Mu (2016), adaptado pelo autor.

O aumento da solubilização dos vários componentes da hemicelulose depende diretamente do aumento da temperatura e de outros fatores, como a umidade e o pH (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). A Tabela 2 evidencia algumas diferenças entre celulose e hemicelulose.

Tabela 2 - Principais diferenças entre celulose e hemicelulose.

Celulose	Hemicelulose
Consiste de unidades de glicose ligadas entre si (natureza homopolissacarídica).	Consiste de várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si (natureza heteropolissacarídica).
Grau de polimerização elevado.	Grau de polimerização baixo.
Forma arranjo fibroso.	Não formam arranjo fibroso.
Forma regiões amorfas e cristalinas.	Forma somente regiões amorfas.
É atacada levemente por ácido inorgânico diluído a quente.	São atacadas rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente.
Insolúvel em álcali.	Solúvel em álcali.

Fonte: Adaptado de Pereira Jr., Couto e Santa'anna, 2008.

2.2.3 Lignina

Trata-se de polímero amorfo, formado por redes tridimensionais ramificadas e compostas por unidades fenil-propano interligadas. Sua estrutura principal provém da polimerização de três diferentes monômeros, constituídos pelos alcoóis hidroxicinâmicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que podem ser observados na Figura 4. Atua como uma espécie de “capa”, proporcionando sustentação à toda a estrutura lignocelulósica, uma vez que auxilia na rigidez da parede celular, bem como confere resistência a ataques microbianos. Apresenta-se como composto heterogêneo, de alta massa molar, de estrutura irregular e não-cristalina, altamente insolúvel em água e recalcitrante (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; BRODEUR *et al.*, 2011; SARKAR *et al.*, 2012; FASANELLA, 2008).

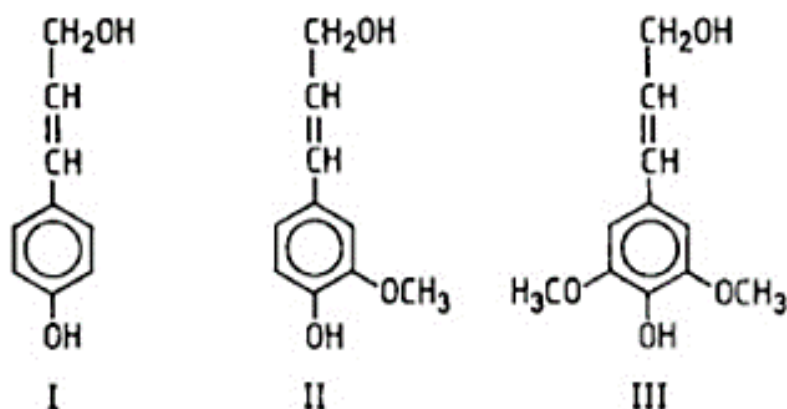


Figura 4 - Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico. Fonte: Fengel e Wegener (1989).

Destaca-se que existem muitos padrões possíveis de ligação entre as unidades individuais que formam a lignina, portanto, o conhecimento da estrutura química da lignina é menos preciso do que de outros polímeros naturais e sintéticos. Na Figura 5 pode ser observado exemplo de fragmento de lignina (PRIEUR, 2017).

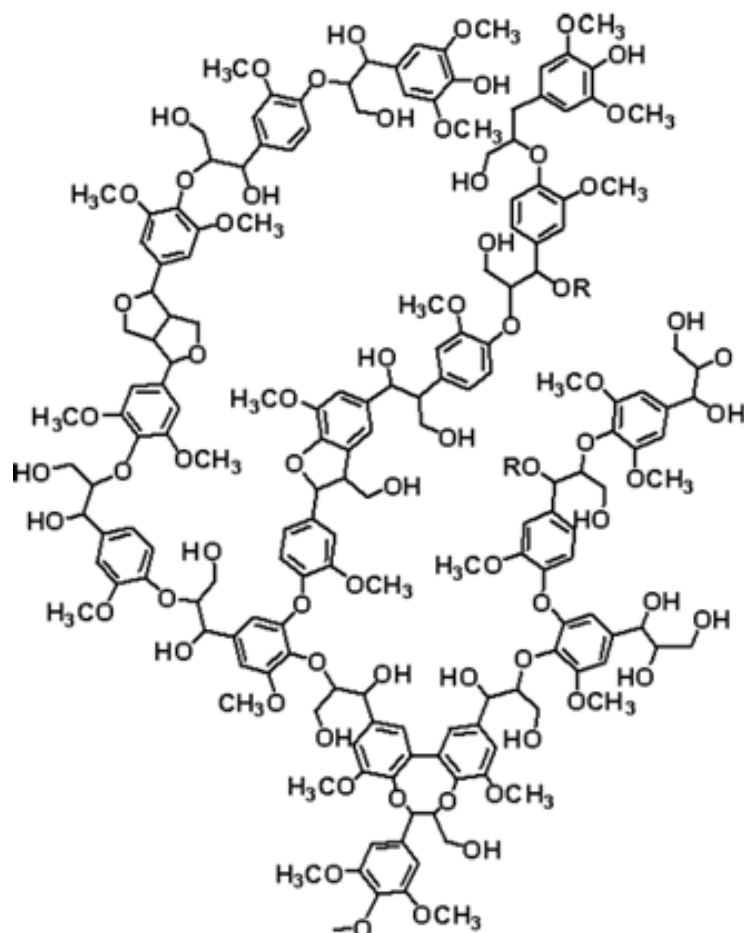


Figura 5 - Exemplo de fragmento de lignina. Fonte: Prieur (2017).

2.2.4 Material proveniente da indústria cacaueira

De acordo com Mororó (2012), durante o processamento do cacau, após a colheita, a maior parte dos resíduos gerados é proveniente da casca do fruto, material lignocelulósico que pode ser utilizado como alternativa para a produção de bioetanol. A Tabela 3 apresenta a composição química (avaliada por umidade, celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas) e bromatológica (avaliada por matéria seca, proteína bruta e fibra bruta) da casca do cacau observada por Mororó (2012) e Silva (2018).

Tabela 3 - Composição química e bromatológica da casca do cacau, seca a 105 °C.

Nutrientes	Mororó (2012) (%)	Silva (2018) (%)
Matéria seca	100,00	-
Umidade	-	7,30 ± 0,47
Proteína bruta	9,00	-
Fibra bruta	50,20	-
Celulose	31,25	32,46 ± 1,34
Hemicelulose	-	20,05 ± 1,59
Lignina	15,68	18,24 ± 0,75
Extrativos	29,20	30,56 ± 1,35
Cinzas	11,60	7,10 ± 0,13

Fonte: Mororó (2012) e Silva (2018).

Apesar de não estar disponível na literatura muitos dados sobre a composição química e bromatológica da casca do cacau, com o intuito de avaliar a viabilidade desta biomassa como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, comparou-se a caracterização da casca de cacau realizada por Mororó (2012) e Silva (2018) com caracterizações de bagaço de cana realizadas por Guilherme *et al.* (2015), Rabelo *et al.* (2011) e Rocha (2016), conforme pode ser observado na Tabela 4. Isto porque o bagaço de cana-de-açúcar é o material lignocelulósico com maior acervo de dados encontrado na literatura.

Tabela 4 - Comparação de caracterizações de casca de cacau e bagaços de cana-de-açúcar de diferentes autores.

Referência	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Silva (2018) *	32,46	20,05	18,24
Mororó (2012) *	31,45	18,75	15,68
Guilherme <i>et al.</i> (2015) **	38,59	27,89	17,79
Rabelo <i>et al.</i> (2011) **	38,4	23,2	25,0
Rocha (2016) **	39,57	26,17	23,33

*: Trabalhos referentes a biomassa proveniente da indústria cacauaieira.

** : Trabalhos referentes a biomassa proveniente da indústria sucroalcooleira.

Fonte: Silva, 2018, adaptado pelo autor.

Ao analisar os dados das composições da casca do cacau encontradas por Silva (2018) e Mororó (2012) e do bagaço de cana de encontrados por Guilherme *et al.* (2015), Rabelo *et al.* (2011) e Rocha (2016), nota-se que a composição da casca de cacau apresenta concordância com a faixa de valores esperada para biomassas do tipo lignocelulósica ao apresentar teores de celulose, hemicelulose e lignina aproximados do bagaço de cana-de-açúcar, espécie comumente utilizada na geração de etanol de primeira e segunda geração.

2.3 Biocombustíveis

Biocombustíveis, por definição, são combustíveis produzidos a partir de biomassa proveniente de fontes renováveis, como o bioetanol e o biodiesel, os quais possuem grande potencial para substituir combustíveis oriundos de fontes fósseis. Desse modo, a utilização de biocombustíveis é uma alternativa econômica e sustentável que agrega valor à produção agrícola e diminui o impacto ambiental causado pela disposição dos resíduos (MALHERBE e CLOETE, 2002, DU *et al.*, 2016; SILVA, 2018).

Dada a grande disponibilidade de culturas agrícolas em decorrência das condições climáticas, o Brasil tem alto potencial para utilização integral das matérias-primas renováveis comumente descartadas como resíduo agrícola. Portanto, estudar meios de produzir e utilizar biocombustíveis é primordial, principalmente por possuir diversas fontes de biomassa provenientes de diferentes safras, ou seja, com características diferentes que podem alterar a qualidade e as características do combustível produzido (PEREIRA JR., COUTO e SANTA'ANNA, 2008; MALHERBE e CLOETE, 2002, DU *et al.*, 2016; SILVA, 2018).

2.3.1 Bioetanol

O etanol de primeira geração é obtido a partir da fermentação alcoólica de carboidratos agrícolas, como por exemplo a cana-de-açúcar e a beterraba. Enquanto o bioetanol, ou etanol de segunda geração, é produzido por meio da quebra de polissacarídeos que constituem a biomassa celulósica ou lignocelulósica, ou seja,

podem ser utilizadas como matéria-prima madeiras, gramíneas, resíduos orgânicos ou quaisquer materiais que contenham celulose ou hemicelulose. Desse modo, estudar a produção de bioetanol lignocelulósico torna-se primordial para o avanço energético sustentável, uma vez que tais materiais apresentam maior disponibilidade por não serem culturas direcionadas à alimentação e, portanto, não exercem influência negativa para a economia (BASTOS, 2007; PITARELO *et al.*, 2012; BANSAL *et al.*, 2013).

Com o lançamento do programa RenovaBio pelo Governo Federal e com a inauguração do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) o Governo Federal tem fomentado o estudo de meios alternativos de produção de etanol, levando em consideração a sustentabilidade ambiental, econômica e social (CTBE, 2010; BRASIL, 2017).

Salienta-se que, para a produção de bioetanol lignocelulósico, é necessária etapa preliminar de hidrólise, ácida ou enzimática, a fim de que os polissacarídeos presentes na estrutura da biomassa utilizada como matéria-prima sejam liberados e transformados em etanol por meio da fermentação (BASTOS, 2007; BANSAL *et al.*, 2013).

2.4 Produção de bioetanol

2.4.1 Pré-tratamento da biomassa cacaueira

Foi reportado, em alguns trabalhos, como Aguiar (2010), Rabelo (2007) e Silva (2018), o uso de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino de biomassa lignocelulósica, uma vez que este composto químico atua como um oxidante químico que promove a dissolução da lignina e hemicelulose de materiais lignocelulósicos. O peróxido de hidrogênio oxida as subestruturas da lignina e hemicelulose em meio alcalino, devido à ação do ânion hidroperóxido (HOO^-), cuja formação ocorre em meio alcalino, o que proporciona ao peróxido de hidrogênio ser um efetivo agente de deslignificação e solubilização dos materiais lignocelulósicos. O meio alcalino favorece, ainda, a decomposição do peróxido de hidrogênio em radicais superóxido (OO^-) e hidroxila (OH^-), principais responsáveis pela oxidação

da estrutura da lignina (GOULD, 1985; ARANTES e MILAGRES, 2009; RABELO *et al.*, 2011).

Aguiar (2010) em seus estudos avaliou a eficiência de dois pré-tratamentos em resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana, palha de milho e palha de trigo) com NaOH a 4% e com H₂O₂ a 1%. O autor observou que os resíduos pré-tratados proporcionaram melhores resultados de atividade enzimática, quando comparados aos não tratados. Bem como, para os três tipos de resíduos estudados, observou os melhores resultados com os resíduos pré-tratados com solução de H₂O₂ a 1%,

A utilização de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino pode ser destacada por apresentar vantagens como: 1) realização do processo em temperatura ambiente e pressão atmosférica; 2) ausência de resíduos na biomassa; 3) baixa ou nenhuma formação de substâncias que inibem a fermentação, pois o peróxido de hidrogênio é totalmente degradado; 4) aprimoramento da digestibilidade enzimática da biomassa; 5) diminuição da cristalinidade da celulose; e 6) melhora no desempenho da etapa de hidrólise (RABELO, FILHO e COSTA, 2008; CHENG *et al.*, 2008). Portanto, este apresenta-se como um composto limpo uma vez que se decompõe somente em água e oxigênio, como descrito na Equação 1, tornando-se uma alternativa promissora para o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos.



2.4.2 Hidrólise

Conforme citado no item 2.3.1, para que biomassa lignocelulósica seja utilizada na produção de bioetanol é necessária a etapa preliminar de hidrólise, que pode ocorrer por duas rotas ácida ou enzimática. Portanto, essa etapa visa à conversão dos polissacarídeos presentes na estrutura da biomassa em açúcares fermentescíveis, sendo uma etapa crucial na produção de etanol (BASTOS, 2007; BANSAL *et al.*, 2013; ANTÔNIO, 2010).

Na hidrólise enzimática, a transformação das cadeias de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis é realizada por um grupo de enzimas celulasas, em que se destacam as endoglucanase, exoglucanase e β-glucosidase, estando presentes,

ainda, uma série de enzimas auxiliares. Ressalta-se que vários fatores podem interferir no desempenho da hidrólise enzimática, como o tipo de pré-tratamento utilizado, a concentração e a adsorção do substrato nas enzimas, bem como, o pH e a temperatura do meio, dentre outros (AGUIAR, 2010; SUN e CHENG, 2002; VALLANDER e ERIKSSON, 1985).

Na hidrólise ácida, por sua vez, a quebra das moléculas de celulose e hemicelulose ocorre por meio da utilização de soluções ácidas. Segundo Ogeda e Petri (2010), o uso de combinações envolvendo a utilização de soluções ácidas, sob efeito de temperatura em um dado tempo de reação, pode resultar em quantidades significativas de açúcares fermentescíveis disponíveis. Segundo Gurgel (2010), a hidrólise ácida pode ser subdividida em processos de ácidos concentrados ($> 5\%$ m/v) e processos de ácidos diluídos ($< 5\%$ m/v), sendo o ácido sulfúrico o comumente utilizado.

Os processos de ácidos concentrados necessitam de alto investimento operacional, uma vez que exigem equipamentos altamente resistentes à corrosão, bem como acarretam em degradação e perda de açúcares, uma vez que a hidrólise da hemicelulose e da celulose ocorrem juntas, mas a hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente do que a celulose. Por outro lado, nos processos de ácidos diluídos, a quebra da hemicelulose e da celulose ocorrem separadamente (OGEDA e PETRI, 2010; RABELO, FILHO e COSTA, 2008).

Desse modo, a primeira etapa da hidrólise com ácido diluído, em que a hemicelulose é hidrolisada, ocorre em condições intermediárias, com temperatura na faixa de 130-190 °C, em um tempo reacional de 10-30 minutos. Já a conversão da celulose em açúcar procede em condições mais severas (aproximadamente 200 °C), o que pode levar à formação de inibidores à fermentação. As soluções ácidas mais comumente utilizadas na literatura são de ácido sulfúrico e ácido clorídrico (SANTOS *et al.*, 2012; RABELO, FILHO e COSTA, 2008).

2.4.3 Fermentação

Trata-se de processo bioquímico que promove a degradação anaeróbica da glicose e outros nutrientes com o intuito de se obter energia. Na fermentação alcoólica, os micro-organismos transformam açúcares em etanol e dióxido de carbono. A adição

da levedura ao hidrolisado marca o início da fermentação, a qual ocorre em três fases: 1) adaptação do micro-organismo ao meio de cultivo; 2) liberação de grandes quantidades de dióxido de carbono, aumento de temperatura e do teor de etanol; e 3) escassez de substrato, resultando em diminuição do crescimento celular e da liberação de dióxido (NELSON e COX, 2014;; SILVA, 2007).

Na literatura, os micro-organismos mais comumente utilizados são as leveduras, destacando-se a *Saccharomyces cerevisiae* por possuir características como: elevada produtividade, eficiência fermentativa e resistência a elevadas concentrações de açúcar (10-20% m/v). Ressalta-se que diversos fatores podem afetar o rendimento da fermentação. Como, por exemplo, temperatura, pH do meio, linhagem da levedura, contaminação microbiana, dentre outros (PACHECO, 2010; SOUZA, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2001; WALKER e WALKER, 2018).

A fim de otimizar processos fermentativos é essencial monitorar o crescimento celular, bem como a metabolização dos açúcares em etanol, para que então medidas de controle sejam adotadas. Dois importantes parâmetros relacionados ao crescimento celular são a viabilidade, definida como a medida da capacidade reprodutiva das células, e a vitalidade, descrita como a medida do percentual de células vivas. Sendo a última o mais importante parâmetro quando se objetiva produzir etanol (WALKER e WALKER, 2018). A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos tem apresentado resultados significativos em relação a produção de etanol. Na literatura, é possível encontrar diversos estudos que utilizam biomassa lignocelulósica, proveniente de diferentes fontes e sob condições variadas, em que é evidenciada a produção de etanol.

Althuri, Srinivas e Banerjee (2017) utilizaram em seu estudo biomassa lignocelulósica proveniente de três espécies, com combinações testadas previamente em outro estudo pelos autores, para produção de etanol. A proporção utilizada foi de 0,6000:0,2031:0,1968 por grama de biomassa mista de *R. communis*, *S. spontaneum* e *S. officinarum*, respectivamente. A biomassa mista foi processada por bioprocessamento parcialmente consolidado (PCBP) que envolve uma etapa de pré-tratamento e sacarificação simultânea não-isotérmica onde uma mistura de lacase (*Pleurotus djamor*) e holocelulase (*Trichoderma reseei* RUT C30) foi utilizada seguida de cofermentação no mesmo reator. O teor máximo de etanol encontrado foi de 62,01 g/L (7,86% v/v).

Em outro estudo, Rahayu *et al.* (2017) conduziram fermentação termofílica a partir de hidrolisado lignocelulósico de *Moorella thermoacetica* transformada, ocorrendo a fermentação de glucose e xilose simultaneamente. A produção de etanol encontrada foi de 1,9 mol_{etanol}/mol_{açúcar}.

Yu *et al.* (2018) estudaram o impacto causado na fermentação ao misturar diferentes fontes de resíduo de jardinagem. O pré-tratamento adotado consistia de banhos de água quente e o resíduo sólido foi diretamente empregado na produção de etanol. A carga de substrato adotada foi de 5% (m/v) para mistura de três biomassas, 10% (m/v) mistura de quatro biomassas e 15% (m/v). Os autores observaram que a mistura foi benéfica à hidrólise empregada, bem como a produção de etanol aumentou com o aumento da carga de substrato.

Fernandes-Klajn *et al.* (2018) compararam estratégias para fermentação de biomassa proveniente da poda de oliveiras, visando produzir etanol. Como pré-tratamento, utilizaram hidróxido de amônio e carvão ativado e o micro-organismo utilizado foi *Escherichia coli*. A partir dos resultados, os autores afirmam que a biomassa lignocelulósica utilizada é apropriada para a produção de etanol, apresentando melhor resultado de 13,86 g de etanol por 100 g de matéria-prima após 46 h de fermentação.

Citam-se, ainda, trabalhos que estudaram a produção de etanol a partir do hidrolisado oriundo do bagaço de cana-de-açúcar, como Singh *et al.* (2013) e Wanderley *et al.* (2013). Nesses trabalhos, foram empregadas concentrações iniciais de açúcar na faixa de 21,40 a 59,69 g/L, obtendo concentrações celulares entre 0,88 e 4,02 g/L e produção de etanol entre 5,33 a 23,58 g/L. O tempo de fermentação nesses estudos foi de até 72 horas.

Apesar de não ser possível encontrar muitos trabalhos na literatura que tenham estudado a fermentação de hidrolisado de cacau, cita-se Silva (2018) que realizou pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, caracterizou a casca *in natura* e pré-tratada de cacau, bem como estudou a hidrólise ácida, sob diferentes concentrações de ácido e de tempo reacional, e a fermentação alcoólica de biomassa cacaueira por 48 horas, encontrando 21,5 °GL de produção de etanol.

2.4.3.1 Principais inibidores

Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), os inibidores podem ser classificados em dois grupos: os originalmente presentes na biomassa, que são facilmente liberados durante o pré-tratamento, e os inibidores produzidos por condições adotadas no pré-tratamento e hidrólise. Na Figura 6, pode ser observado a procedência dos inibidores mais comumente encontrados em biomassa lignocelulósica.

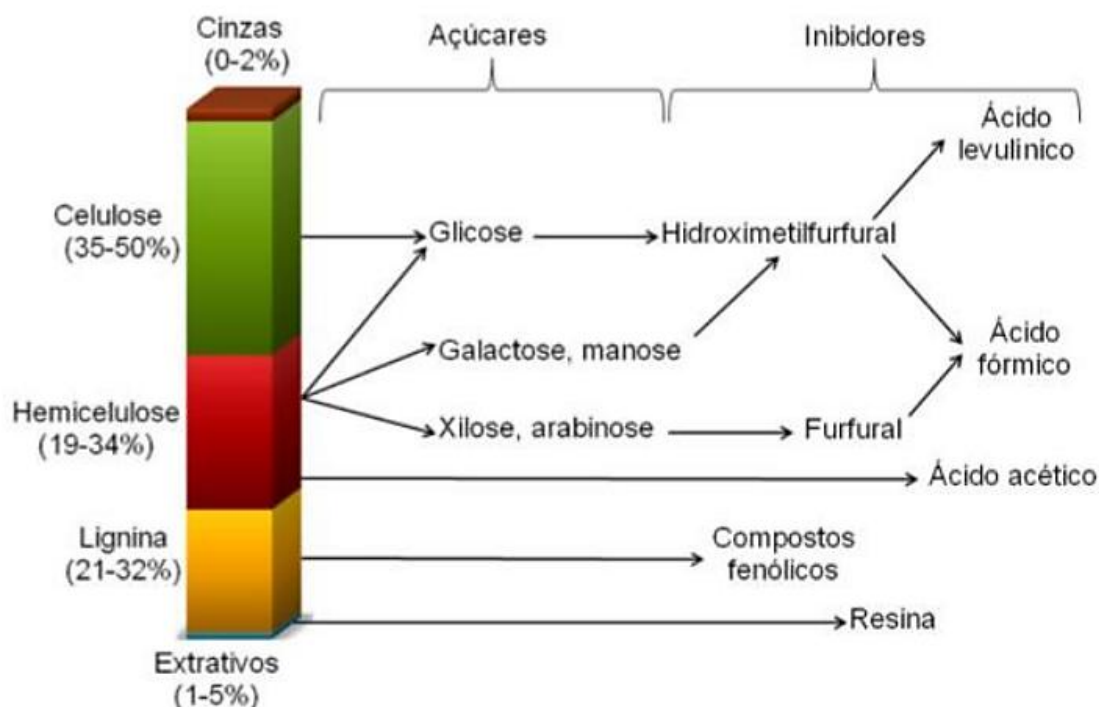


Figura 6 - Formação dos principais componentes inibitórios ao processo fermentativo. Fonte: Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 7 representa as etapas realizadas para preparação da casca de cacau *in natura* a fim de que pudesse ser realizada fermentação alcoólica. As etapas serão abordadas de modo aprofundado nos subitens de preparação (3.1.1), pré-tratamento (3.1.2), hidrólise ácida (3.2) e fermentação (3.4).

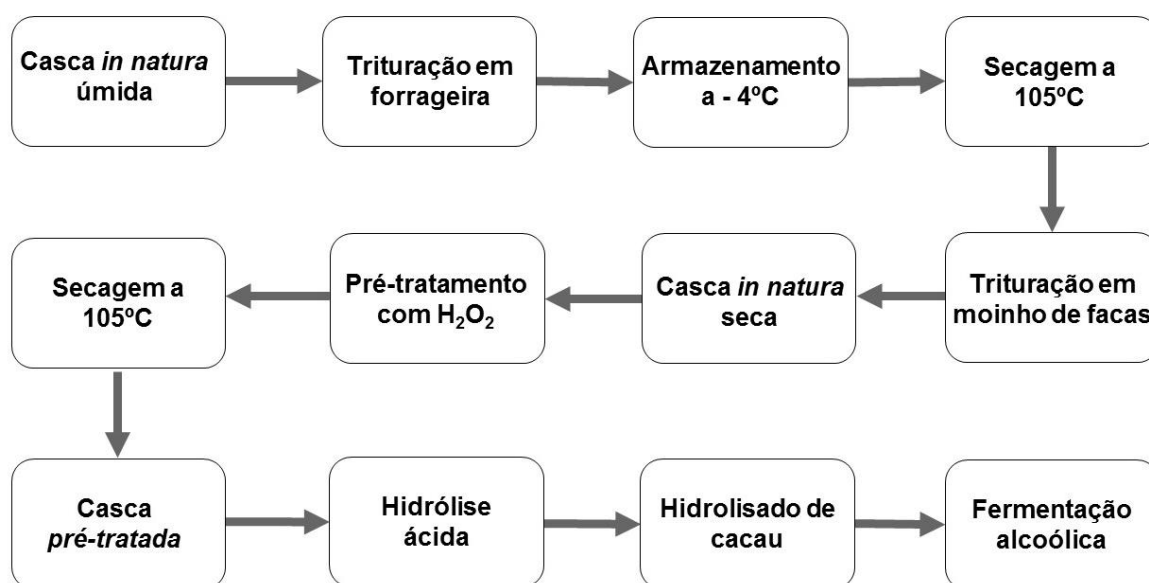


Figura 7 - Fluxograma das etapas de preparação da casca de cacau *in natura* para aplicação na fermentação alcoólica. Fonte: próprio autor.

3.1 Matéria-prima e pré-tratamento

3.1.1 Biomassa

Foram utilizadas amostras de casca de cacau provenientes das safras de 2017 e 2018, fornecidas pela parceria com a Agroindústria Chocolates Espírito Santo, situada em Rio Novo do Sul/ES. A fim de iniciar a parte experimental, as cascas foram trituradas em uma forrageira (Trapp, TRF 80 junior), e armazenadas em sacos plásticos datados e congeladas a -4 °C. Após período de congelamento, procedeu-se uma etapa de secagem em estufa (Quimis, Q314M-32) a 105°C, por aproximadamente 8 horas, e em seguida, as amostras foram trituradas novamente,

em moinho de facas (Marconi). Após a preparação, as cascas de cacau secas foram acondicionadas em sacos plásticos, em temperatura ambiente, conforme procedimento adotado por Silva (2018).

3.1.2. Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino

O procedimento para o tratamento utilizado no presente estudo foi o mesmo utilizado por Silva (2018), adaptado de Rabelo (2007) e visou permitir que houvesse maior disponibilidade de celulose para a etapa de hidrólise e decréscimo nos teores de lignina e hemicelulose.

Dessa forma, foram utilizados 19 g de casca de cacau seca e triturada para 600 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 7,355% (v/v). O pH do meio foi, inicialmente, ajustado com NaOH para 11,5 e a temperatura mantida ao longo do tempo reacional a 45 °C com a ajuda de um chapa aquecedora. O procedimento ocorreu em um béquer agitado mecanicamente por 1 hora. Em seguida, a amostra foi lavada 12 vezes consecutivas com 1 L de água deionizada, com o auxílio de peneira granulométrica, mesh 270. Posteriormente, o material foi acondicionado em placas de Petri e encaminhado à estufa (Quimis, Q314M-32) a 105 °C, até que atingisse peso constante. Em seguida, as cascas pré-tratadas foram acondicionadas em sacos plásticos, sem ar e em temperatura ambiente.

3.2 Hidrólise ácida

Com o intuito de obter glicose a partir da celulose presente no material obtido na etapa 3.1, foi realizada a hidrólise empregando-se solução de ácido sulfúrico diluído, segundo procedimento realizado por Silva (2018). Em seus estudos, apesar de o autor observar melhor resultado de concentração de ART ($13,40 \text{ g.L}^{-1}$) no tempo de 90 minutos e concentração de ácido de 0,34% (m/v).

Todavia as análises estatísticas do mesmo autor evidenciaram que o fator tempo foi o mais significativo e que a variação da concentração de ácido não foi significativa. Ao adotar a concentração de ácido igual a de Silva (2018), obteve-se hidrolisado com ART menor do que 10 g/L, assim, procedeu-se com testes variando a

concentração de ácido, mas mantendo o tempo de 90 minutos. O melhor resultado de ART observado foi com a concentração de ácido a 0,7% (m/v).

Para cada hidrólise ácida foram utilizados 10 g de casca pré-tratada, em um erlenmeyer de 500 mL. Adicionou-se, a seguir, 150 mL de solução de ácido sulfúrico a 0,7% (m/v). Cada erlenmeyer foi tampado com papel alumínio e encaminhado à autoclave vertical (Phoenix Luferco) para a reação de hidrólise por 90 minutos. A contabilização do tempo inicial começou quando o equipamento atingiu temperatura igual a 120 °C. Após o tempo reacional, retirou-se o erlenmeyer que foi arrefecido, para que a filtração à vácuo fosse realizada. Em seguida, o hidrolisado líquido foi transferido para um balão de 1 L, sendo o volume ajustado com água deionizada. Ressalta-se que o hidrolisado final foi acondicionado em frasco tampado, sob refrigeração a 4 °C, de modo a garantir sua conservação.

A fim de averiguar a concentração de açúcar presente em cada hidrolisado, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Kasuki IL-227) pelo método descrito no item 3.3.

3.3 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Visando determinar a concentração de ART tanto no hidrolisado, quanto no fermentado, adotou-se metodologia proposta por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), sendo esta uma variante da metodologia de Bernfeld (1955) e Miller (1959), em que todas utilizam o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

3.3.1 Solução DNS

Para que seja seguida a metodologia supracitada, fez-se necessário, primeiramente, preparar solução com o ácido 3,5-dinitrosalicílico a 1%. Desse modo, confeccionou-se solução denominada A com 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, adicionados a 200 mL de solução 2 mol/L de hidróxido de sódio recém-preparada. Em paralelo, confeccionou-se solução B com 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, dissolvidos em 500 mL de água deionizada, sob aquecimento a 50 °C e agitação constantes. Sob as mesmas condições, adicionou-se a solução A à solução B até

completa dissolução do DNS. Aguardou-se até total resfriamento da nova solução para que fosse transferida para balão volumétrico de 1000 mL, aferindo-se o volume com água deionizada. A solução de DNS preparada foi armazenada em frasco de vidro, etiquetado e ao abrigo de luz.

3.3.2 Quantificação dos açúcares redutores totais

Com o intuito de quantificar a concentração de ART, adicionou-se em tubos de ensaio 1,0 mL de cada amostra do hidrolisado, ou fermentado, da casca de cacau e o mesmo volume da solução de DNS previamente preparada. Os tubos foram aquecidos em banho à quente por 5 minutos, a aproximadamente 95 °C, com o intuito de que ocorresse reação de formação de cor avermelhada que indica a presença de açúcar na amostra. Imediatamente após, os tubos foram imersos em banho à frio, para interromper a reação. O volume em cada tubo foi ajustado para 15 mL com água deionizada. Feita a homogeneização das amostras, foram feitas leituras, em duplicata, das absorbâncias em espectrofotômetro (Kasuki IL-227), com comprimento de onda a 540 nm.

Quando a leitura de absorbância for maior que 0,999, faz-se necessário diluir as amostras para determinação do ART, de modo que o valor observado esteja contido no intervalo da curva de calibração elaborada. Tal diluição precisa ser devidamente anotada, uma vez que interfere no cálculo final da concentração de açúcar.

3.4 Fermentação

Ensaio de fermentação alcoólica foram realizados com o intuito de avaliar a influência da concentração inicial de levedura e da suplementação de substrato, na forma de glicose, na produção de etanol a partir da casca de cacau. As condições idealizadas dos experimentos realizados podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Resumo das condições experimentais idealizadas nos ensaios de fermentação.

Ensaio fermentativo	Concentração celular (g/L)	Suplementação de glicose (g/L)
1	3,0	12,50
2	1,0	12,50
3	5,0	12,50
4	1,6	17,80
5	1,6	7,20

Fonte: próprio autor.

3.4.1 Preparação do inóculo

Para realizar os ensaios fermentativos fez-se necessária preparação de inóculo a partir da levedura enológica seca e ativa *Saccharomyces cerevisiae* (marca Red Star®). Utilizou-se substratos do meio *Yeast extract-Peptone-Dextrose* - YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 4% de glicose) e 0,25% de levedura, seguindo recomendações do fabricante. Os inóculos foram cultivados em incubadora shaker (Cienlab) a 30 °C e 300 h⁻¹ pelo período de 18 a 24 horas. Todo o procedimento descrito foi realizado em condições estéreis e com pH inicial do hidrolisado previamente ajustado em 5,5, conforme adotado por Silva (2018).

3.4.2 Concentração celular

Objetivando avaliar a concentração celular do meio fermentativo ao longo do tempo, foram analisadas amostras de cada fermentação nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42 e 48h, seguindo procedimento adotado por Silva (2018). Para tanto, transferiu-se 0,2 mL de amostra de fermentado para balão volumétrico de 10 mL, aferindo-se o volume com água deionizada. Em seguida, foram feitas leituras de absorbância em duplicata utilizando espectrofotômetro (Kasuaki IL-227), no comprimento de onda de 570 nm.

A média dos valores encontrados ($Abs_{média}$) foram correlacionados com curva de calibração previamente construída, vide Apêndice B ($Coef_{linear}$ e $Coef_{angular}$),

conforme descrito na Equação 2, em que d é o inverso da diluição. Ressalta-se ser de extrema importância que as leituras para determinação de concentração celular sejam feitas imediatamente após a preparação da solução, bem como, deve-se agitar as cubetas de leitura antes que sejam colocadas no aparelho, a fim de homogeneizar a amostra.

$$C_{cel} = \frac{(Abs_{média} - Coef_{linear})}{Coef_{angular}} \cdot d \quad (2)$$

3.4.3 Ensaio fermentativos

Para que fossem iniciados os ensaios de fermentação, foi realizada assepsia dos reatores com álcool 70% (v/v). O hidrolisado, com pH previamente ajustado a 5,5, e vidrarias utilizadas passaram por autoclave vertical (Phoenix Luferco), a 120 °C, por 20 minutos. Os ensaios ocorreram em reatores (Marconi) com capacidade de 0,5 e 3 L (modelos MA 502/D e MA 502/3), ambos agitados mecanicamente a 150 h⁻¹, com temperatura controlada a 30 °C mediante auxílio de banho ultratermostático, em batelada e sem aeração.

Após decorrido o período de preparo do inóculo, todo o volume cultivado foi transferido para um único erlenmeyer, homogeneizado e realizada coleta de amostra, em triplicata, a fim de determinar a concentração celular, conforme descrito no item 3.4.2. Tal etapa foi realizada com o intuito de determinar o volume de inóculo a ser adicionado em cada ensaio fermentativo, calculado pela Equação 3, em que C representa concentração (g/L) e V volume (L). Quando utilizado o reator de 3 L o volume reacional foi de 1 L, já quando utilizado o reator de 0,5 L, o volume reacional foi de 0,35 L.

$$C_{planejada} \cdot V_{reator} = C_{lida} \cdot V_{inóculo} \quad (3)$$

Os experimentos foram conduzidos por 48 horas, conforme procedimento adotado por Silva (2018), sendo coletadas amostras nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42 e 48h, com o intuito de analisar a concentração celular e a

concentração de açúcares totais (ART) ao longo da fermentação. Também, foram coletadas amostras de cerca de 30 mL nos tempos de 24 e 48 h a fim de que fossem destiladas para quantificar o etanol produzido. As amostras foram armazenadas em recipientes em condições de assepsia, tampados e acondicionados a -4°C para posterior análise de ART e etanol.

3.5 Destilação

Procedeu-se com a destilação das amostras nos tempos de 24 e 48 horas, sendo cada amostra transferida para balão de 500 mL, acoplado a um sistema de destilação, conforme pode ser observado na Figura 8, seguindo o mesmo procedimento adotado por Silva (2018).



Figura 8 - Sistema montado para destilação. Fonte: próprio autor.

Ao destilador, foi ligado um banho ultratermostático à 10°C . Visto que a temperatura de ebulição do etanol é 78°C , a manta aquecedora foi regulada de modo que a temperatura permanecesse constante em uma determinada faixa. As primeiras gotas destiladas foram descartadas, procedendo com a destilação por aproximadamente 1 hora. Os destilados foram armazenados em béqueres tampados

com papel filme, envoltos em papel alumínio, identificados e guardados em geladeira por no máximo 24 h antes de serem determinados seus respectivos teores alcoólicos.

3.5.1 Determinação do teor alcoólico

Seguiu-se procedimento da NBR 13920 (ABNT, 1997) visando determinar o teor alcoólico do destilado, conforme adotado por Silva (2018). Tal procedimento consiste na oxidação do etanol pelo dicromato de potássio a 10% (m/v) em meio ácido, originando compostos coloridos.

Foram retirados 0,02 mL de amostra do destilado e transferidos para tubo de ensaio com tampa, onde foram adicionados 5,0 mL de água deionizada. A cada tubo foi adicionado, em capela, 5,0 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente; passado 1 minuto, adicionou-se 1,0 mL da solução de dicromato. Os tubos foram agitados e resfriados à temperatura ambiente. Procedeu-se, em seguida, a leitura em duplicata de absorbância em espectrofotômetro (Kasuki IL-227), no comprimento de onda a 600 nm. O teor alcoólico das amostras, em °GL, foi calculado conforme descrito no Apêndice C

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios Fermentativos

Pode ser observado um resumo dos resultados obtidos nos ensaios fermentativos na Tabela 6, sendo apresentados os valores para as concentrações celulares inicial e final, em g/L; a concentração de glicose suplementada em cada ensaio, em g/L; as concentrações de ART inicial, final e sua variação ao longo dos ensaios, em g/L; a eficiência da fermentação expressa em porcentagem de variação de ART; os teores de etanol, em °GL, em 24 e 48 h; bem como os valores de velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$), em h^{-1} , encontrados em cada ensaio. No Apêndice D encontram-se listados todos os resultados de ART e concentração celular obtidos para cada ensaio ao longo da fermentação. No Apêndice E encontram-se as curvas de crescimento celular para cada ensaio fermentativo, a partir das quais foram obtidos os valores de velocidade específica máxima de crescimento da levedura ($\mu_{\text{máx}}$).

Tabela 6 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios fermentativos.

Ensaio	1	2	3	4	5
X inicial (g/L)	1,88	0,74	2,48	0,80	1,00
X final (g/L)	2,27 (48h)	3,24 (42h)	3,39 (42h)	5,28 (36h)	5,03 (48h)
Glicose Suplementada (g/L)	12,5	12,5	12,5	17,8	7,2
ART inicial (g/L)	13,5 (2h)	19,9 (10h)	16,7 (2h)	16,4 (4h)	15,2 (6h)
ART final (g/L) (48h)	10,6	16,8	12,3	12,9	12,5
Δ ART (g/L)	2,9	3,1	4,4	3,5	2,8
Δ ART (%)	21,3	15,7	26,3	21,2	18,2
Teor de etanol (°GL - 24 h)	-	3,5	1,3	2,7	-
Produtividade (g/L.h - 24 h)	-	0,15	0,05	0,11	-
Teor de etanol (°GL - 48 h)	1,1	-	3,0	5,8	4,3
Produtividade (g/L.h - 48 h)	0,02	-	0,06	0,12	0,09
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,016	0,167	0,022	0,155	0,145

X = Concentração celular.

Fonte: próprio autor.

A partir dos dados apresentados na Tabela 6, observa-se que os ensaios 4 e 5, realizados com baixa concentração celular inicial, 0,80 e 1,00 g/L, apresentaram maiores crescimentos celulares, 5,28 e 5,03 g/L, respectivamente. Nesses ensaios também foram observados os maiores teores de etanol em 48 h de fermentação, 5,8 e 4,3 °GL, respectivamente. Segundo Lima *et al.* (2001), elevado teor de levedura exige maior consumo de açúcar a fim de se manter as células vivas, bem como resulta em maior competição entre as células pelos nutrientes disponíveis no meio, diminuindo a viabilidade da levedura. Portanto, nos ensaios realizados com menores concentrações iniciais celular houve menos competição entre as células pelos nutrientes nas horas iniciais de cultivo e conseqüentemente obteve-se alta velocidade específica de crescimento.

Por outro lado, para o ensaio 2, que foi realizado em uma concentração celular inicial próxima dos ensaios citados anteriormente, 0,74 g/L, e teor de açúcar inicial intermediário, observou-se o maior teor de etanol em 24 h, 3,5 °GL e, conseqüentemente, uma maior produtividade, 0,15 g/L.h. Em 24 h, observou-se produtividade de 0,11 g/L.h para o ensaio 4, valor relativamente próximo ao observado para o ensaio 2.

Apesar de se esperar maior produtividade de etanol no ensaio 4, iniciado com a suplementação de glicose mais alta, ressalta-se não ter sido possível obter dado satisfatório para a produção de etanol em 48 h do ensaio 2, o que possibilitaria uma análise mais ponderada dos ensaios. O ensaio 4 que apresentou maior produção de etanol em 48 h (5,8 °GL), também apresentou maior crescimento celular e maior consumo percentual de açúcar (26,3%), resultado em concordância com Dashko *et al.* (2014), pois segundo os autores, o crescimento celular está diretamente relacionado com o consumo de substrato, uma vez que as leveduras produzem etanol ao metabolizar açúcares.

O baixo consumo de ART apresentado de forma geral nos ensaios, na faixa de 2,8 a 4,4 g/L, que representam menos de 27% do consumo de açúcar disponível, também foi observado por Silva (2018) que obteve consumo de 2,1 g/L. Tal fato pode ter ocorrido devido à presença de inibidores de formação de produto.

Segundo Najafpour (2015) e Fan *et al.* (2015), fermentações em sistema de batelada, como a realizada no presente estudo, podem ser influenciadas negativamente por alto teor de substrato e inibição de formação de produto. Bem como, segundo Brethauer e Wyman (2010) e Machado e Abreu (2006), a hidrólise

ácida gera produtos secundários indesejados que interferem custosamente no processo de fermentação, como por exemplo furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, fenol, formaldeído e outros.

Outro fator que pode ter influenciado o consumo de açúcar é que, segundo Volpe (1997), no processo fermentativo que envolve mais de um tipo de açúcar, as células demoram para produzir todas as enzimas e proteínas de transporte necessárias para o metabolizar as pentoses presentes, como é o caso de hidrolisado de resíduos lignocelulósicos.

Em relação à velocidade específica máxima de crescimento celular, observou-se valores na faixa de 0,145 a 0,167 h⁻¹ para os ensaios 2, 4 e 5, os quais foram superiores aos demais ensaios. Bem como, foram observados os maiores teores de etanol para os ensaios citados. Tais fatos encontram-se em concordância com o observado por Fan *et al.* (2015), que em seus estudos notaram a maior produtividade de etanol no experimento em que houve maior crescimento celular.

Os teores de etanol encontrados neste trabalho se encontram comparados com dados da literatura para produção de etanol utilizando a biomassa lignocelulósica, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação entre teores de etanol proveniente da fermentação de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Referência	Material lignocelulósico	Teor de etanol
Presente estudo	Casca de cacau	0,5 a 5,8 °GL
Silva (2018)	Casca de cacau	19,2 a 21,5 °GL
Althuri, Srinivas e Banerjee (2017)	Mistura de <i>R. communis</i> , <i>S. spontaneum</i> e <i>S. officinarum</i>	7,86 °GL
Pereira (2014)	<i>Cyperus esculentus</i>	12 a 26 °GL
Lopes (2003)	Batata-doce	6,85 a 32,37 °GL

Os baixos valores de etanol encontrados podem ter sido influenciados negativamente durante a destilação do fermentado, gerando valores subestimados, uma vez que a ebulição do etanol ocorre a 79 °C (PETROBRAS, 2018), todavia a temperatura interna do destilador apresentava equilíbrio a partir de 90 °C, o que pode ser explicado devido à alta concentração de água no fermentado que pode ter alterado a temperatura de ebulição do meio.

Ressalta-se ainda que a análise pelo método do dicromato de potássio pode ter interferido negativamente nos resultados encontrados no presente estudo. Assim, sugere-se que em trabalhos futuros o etanol possa ser medido por cromatografia, a fim de estimar valores mais precisos na análise.

4.2 Influência da concentração celular

Os ensaios 1, 2 e 3 foram realizados com a mesma suplementação de glicose, 12,5 g/L, e concentração celular inicial de 1,88, 0,74 e 2,48 g/L, respectivamente. Assim, tais ensaios foram selecionados a fim de se avaliar a influência da concentração celular inicial no processo fermentativo. As curvas obtidas com os valores de concentração celular ao longo das 48 horas de ensaio fermentativo para os ensaios 1, 2 e 3 podem ser observadas na Figura 9.

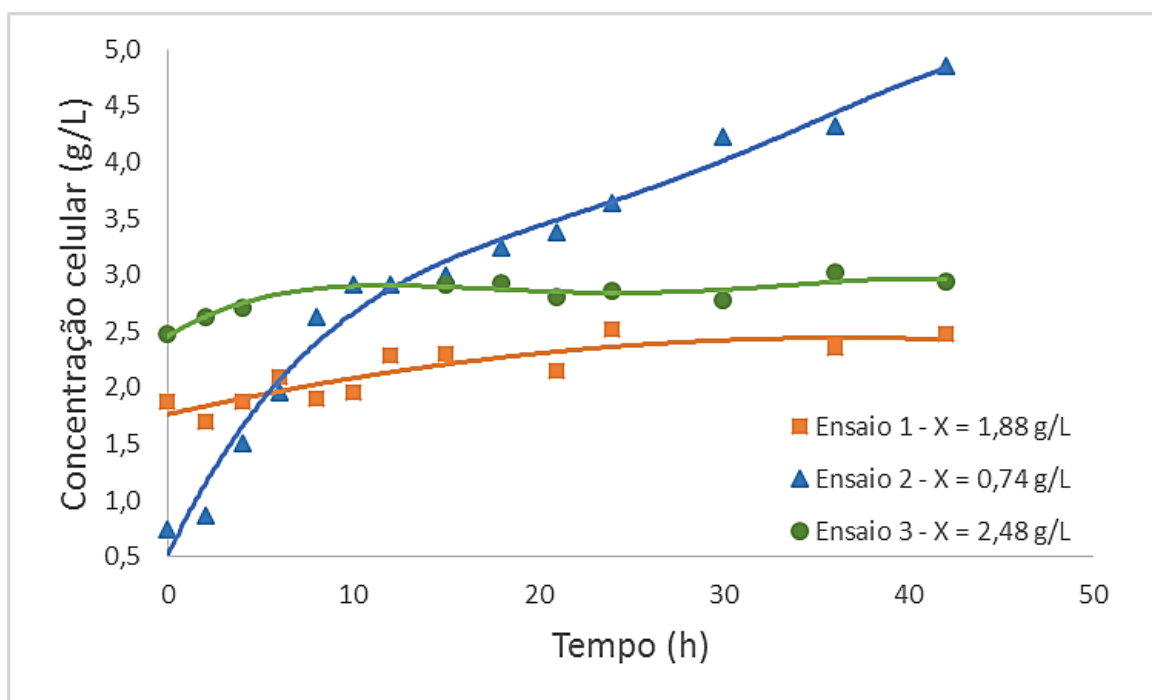


Figura 9 - Curvas de concentração celular (g/L) em função do tempo nos ensaios 1, 2 e 3, em que X é a concentração celular inicial. Fonte: próprio autor.

Em relação ao crescimento celular, observou-se que o ensaio 1 foi o único a apresentar fase *lag*, no intervalo de 0 a 2 h, além de apresentar crescimento lento e com baixa velocidade. O ensaio 3 também apresentou baixa velocidade de

crescimento celular, por outro lado, o ensaio 2 evidencia crescimento exponencial com maior velocidade de crescimento das células, o que indica boa adaptação ao meio fermentativo. Segundo Walker e Walker (2018), um fenômeno que pode ocorrer durante a fermentação alcoólica é a aglomeração espontânea de células em suspensão, sendo tal efeito indesejável quando se utiliza *Saccharomyces cerevisiae*, pois dificulta a transferência de massa, diminuindo, assim, o contato da levedura com os açúcares e afetando negativamente seu crescimento celular.

Além da concentração celular do meio e da aglomeração espontânea, outro fator importante para o crescimento celular, segundo Dussap e Poughon (2017), é a quantidade de nitrogênio e outros compostos metabolizados pela levedura. Isto porquê a atividade fermentativa das células está relacionada à quantidade de nitrogênio consumida durante a fase de crescimento.

Conforme Tabela 6, o ensaio 2 realizado com menor concentração celular inicial, 0,74 g/L obteve maior $\mu_{\text{máx}}$, $0,167 \text{ h}^{-1}$, quando comparado aos ensaios 1 e 3. Tal resultado evidencia que maiores concentrações iniciais de células não proporcionaram um maior crescimento celular, mesmo com excedente de açúcar disponível no meio. Segundo Lima *et al.* (2001), a baixa concentração celular inicial pode ter facilitado a difusão da glicose para as células, havendo menor competição pelo substrato e, assim, induzindo as células ao crescimento

Observou-se ainda que, apesar do ensaio 3 apresentar valores próximos de concentração celular em relação ao ensaio 2, 3,39 e 3,24 g/L, respectivamente, as células do ensaio 2 cresceram mais e com maior velocidade, o que pode ter ocorrido pelo fato das células terem se adaptado melhor ao meio de cultivo por existirem menos inibidores no meio.

Segundo Walker e Walker (2018), o fator em que o etanol é produzido durante a fermentação está diretamente relacionado à taxa de crescimento celular. O que reitera os resultados obtidos, em que o ensaio 2, com maior velocidade específica máxima, também apresentou maior teor de etanol em 24 horas, 3,0 °GL.

Em relação, ainda, aos ensaios 1, 2 e 3 ao comparar os resultados de ART obtidos ao longo do tempo (Figura 10), observa-se que houve pouca variação em relação aos valores de açúcar consumidos ao longo do cultivo.

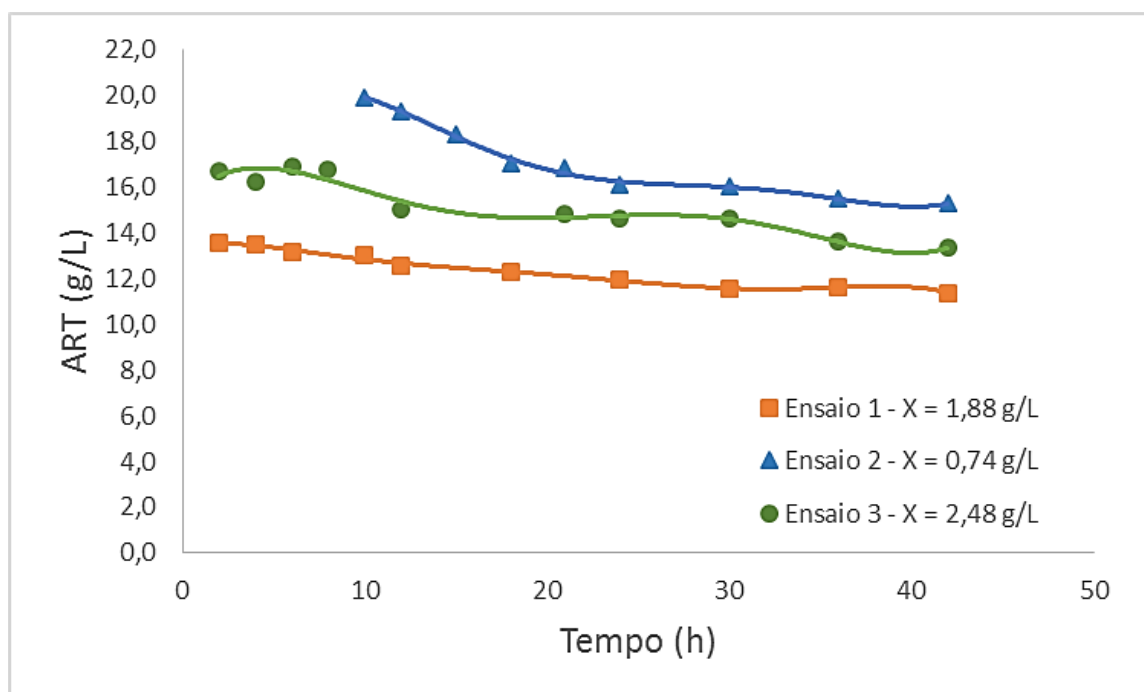


Figura 10 - Curvas de concentração de ART (g/L) em função do tempo nos ensaios 1, 2 e 3, em que X é a concentração celular inicial. Fonte: próprio autor.

Foi possível notar estabilização no consumo de açúcar a partir de 12 horas de fermentação para os ensaios 1 e 3 e observou-se maiores concentrações de ART no ensaio 2, bem como evidente consumo de açúcar até cerca de 21 h de cultivo. Segundo Lucero, Moreno e Lagunas (2012) e Volpe (1997) a levedura consome, primeiramente, toda a glicose disponível no meio antes de outras fontes de carboidrato, assim, é possível inferir que o ensaio iniciado com menor concentração celular inicial, sob a mesma suplementação de açúcar, consumiu toda a glicose antes de quaisquer outras fontes de carboidrato.

4.3 Influência da suplementação de glicose

A fim de avaliar a influência da suplementação realizada com glicose, comparou-se os resultados obtidos nos ensaios 2, 4 e 5, uma vez que esses foram realizados com concentração celular inicial próximas (0,74, 0,80 e 1,00 g/L, respectivamente) e com suplementações diferentes: o ensaio 2 recebeu 12,5 g/L de glicose, o ensaio 4, 17,8 g/L, e o ensaio 5, 7,2 g/L de glicose. As curvas obtidas com os valores de

concentração celular ao longo das 48 horas de fermentação para esses ensaios podem ser observadas na Figura 11.

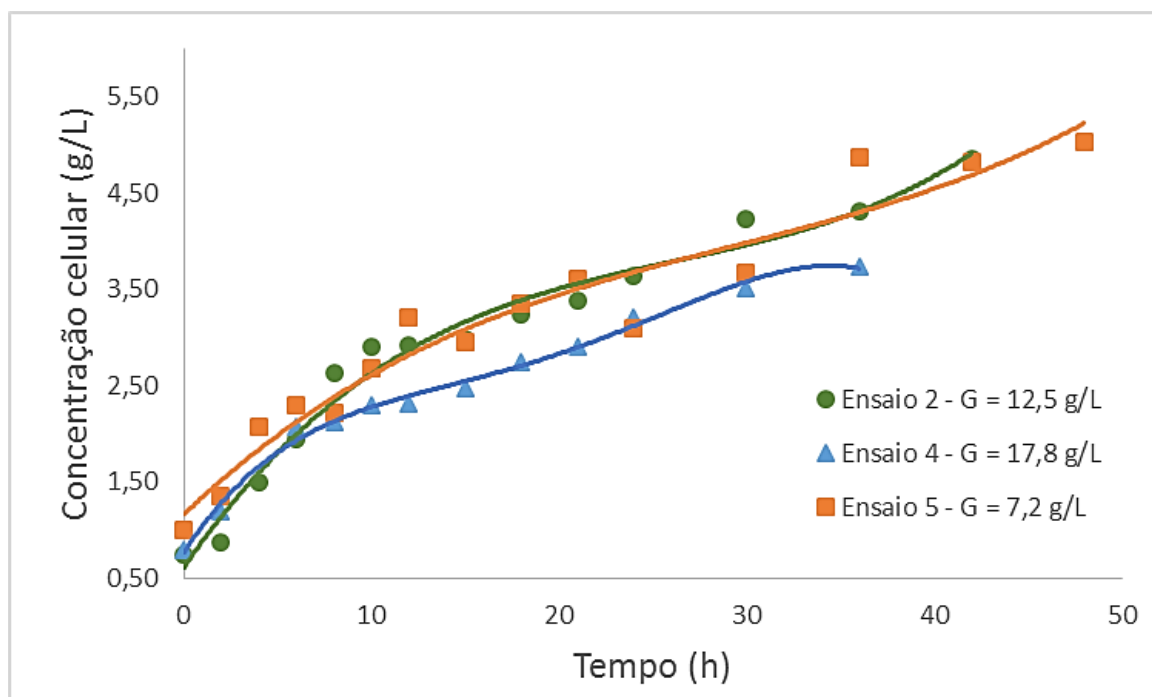


Figura 11 - Curvas de concentração celular (g/L) em função do tempo nos ensaios 2, 4 e 5, em que G é a concentração de glicose suplementada. Fonte: próprio autor.

O crescimento celular dos ensaios 2, 4 e 5 resultaram em tendências aproximadas, em que as curvas dos ensaios 2 e 5 quase se sobrepõem. Tal fato evidenciou que quando o processo fermentativo foi iniciado com baixa concentração celular, obtém-se crescimento celular com fase exponencial evidente e sem a presença de fase *lag*, o que indica boa adaptação das células ao meio fermentativo, mesmo que hajam diferentes fontes de açúcares presentes no meio.

Os resultados obtidos para o ensaio 4 evidenciaram ligeiro decaimento no crescimento celular, ficando mais lento a partir de 10 horas de cultivo. Tal ensaio foi realizado com a maior concentração de suplementação de glicose, assim era de se esperar que demonstrasse maior crescimento celular. Todavia, segundo Cruz (2015), quanto maior for a adição de açúcares no início da fermentação, maior será a concentração de ART ao final da fermentação, e que o excesso de açúcares no meio de cultivo pode inibir o crescimento celular.

Ao se comparar os resultados de ART obtidos ao longo do tempo (Figura 12), observou-se que os ensaios 2 e 4 que receberam maiores concentrações de glicose

em suas suplementações, 12,5 e 17,8 g/L, respectivamente, apresentaram queda mais evidente no consumo de açúcar no meio. Segundo Lucero, Moreno e Lagunas (2012) e Volpe (1997), quando existe no meio fermentativo mais de uma fonte de carbono, as leveduras consomem preferencialmente o açúcar com menor tempo de indução, ou seja, a glicose é metabolizada antes de qualquer outra fonte. Volpe (1997) observou, ainda, em seus estudos que quando é utilizado como fonte de carbono a sacarose, glicose ou frutose no processo fermentativo, este é realizado em menor tempo se comparado a outras fontes de açúcar como as pentoses.

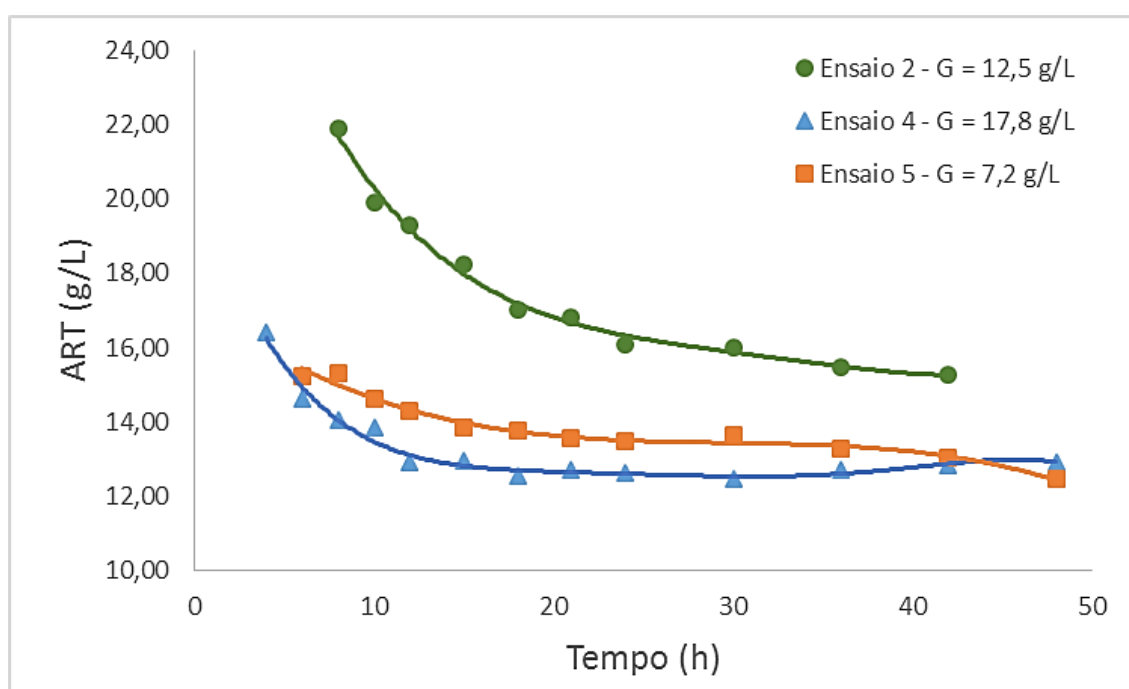


Figura 12 - Curvas de concentração de ART (g/L) em função do tempo nos ensaios 2, 4 e 5, em que G é a concentração de glicose suplementada. Fonte: próprio autor.

Em relação à velocidade específica máxima de crescimento celular, os ensaios 2, 4 e 5 atingiram valores superiores aos demais ensaios, em concordância com as curvas cinéticas apresentadas no Apêndice E, 0,167, 0,155 e 0,145 h⁻¹, respectivamente.

Em relação aos teores de etanol, os ensaios 4 e 5 foram os que obtiveram maior resultado em 48 horas de fermentação, 5,8 e 4,3 °GL, respectivamente. Enquanto o ensaio 2 apresentou a maior produção de etanol em 24 horas, 3,5 °GL, não tendo sido obtido resultado para as 48 horas.

Todavia ao se comparar o teor de etanol dos ensaios 2 e 4, em 24 horas, nota-se que o ensaio 4 apresenta menor valor do que o ensaio 2, 2,7 e 3,5 °GL, respectivamente. Tal qual a produtividade, em 48 horas, em que para o ensaio 2 observou-se 0,15 g/L.h e para o ensaio 4, 0,11 g/L.h, e a velocidade máxima específica. Segundo Cruz (2015) altos teores de açúcar no início da fermentação inibem o crescimento celular, que está diretamente relacionado à produção de etanol. Portanto, os menores valores observados no ensaio 4, em relação ao 2, pode ser justificado devido a maior concentração de glicose suplementada no início da fermentação.

4.4 Influência da presença de inibidores

Conforme já citado, existem alguns fatores que podem inibir o crescimento celular. Segundo Najafpour (2015) e Fan *et al.* (2015), o alto teor de substrato é um dos principais inibidores em fermentações em batelada. Bem como, segundo Brethauer e Wyman (2010) e Machado e Abreu (2006), durante a etapa de hidrólise acabam sendo gerados produtos secundários que afetam negativamente o processo fermentativo. E, segundo Volpe (1997), quando há mais de uma fonte de açúcar no meio, as células demoram para produzir todas as enzimas e proteínas de transporte necessárias para o metabolizar as pentoses.

Diante do exposto, com o intuito de avaliar a influência da presença de inibidores no meio fermentativo ao utilizar hidrolisado de biomassa lignocelulósica cacaueira, comparou-se os resultados obtidos para o ensaio 2 (Figura 13), por ter apresentado a maior velocidade específica máxima dentre os ensaios realizados no presente estudo, com os resultados obtidos por Silva (2018) para cultivo em apenas glicose (Figura 14).

O ensaio 2 recebeu suplementação de glicose de 12,5 g/L, atingindo ART inicial de quase 20 g/L. Observou-se concentração celular inicial de 0,74 g/L e final de 3,24 g/L, obtendo velocidade específica máxima de 0,167 h⁻¹. O crescimento celular ao longo da fermentação demonstra tendência exponencial, indicando boa adaptação das células ao meio. O consumo de açúcares para o ensaio 2 foi de 15,7%, sendo observado significativo consumo até as 18 primeiras horas da fermentação.

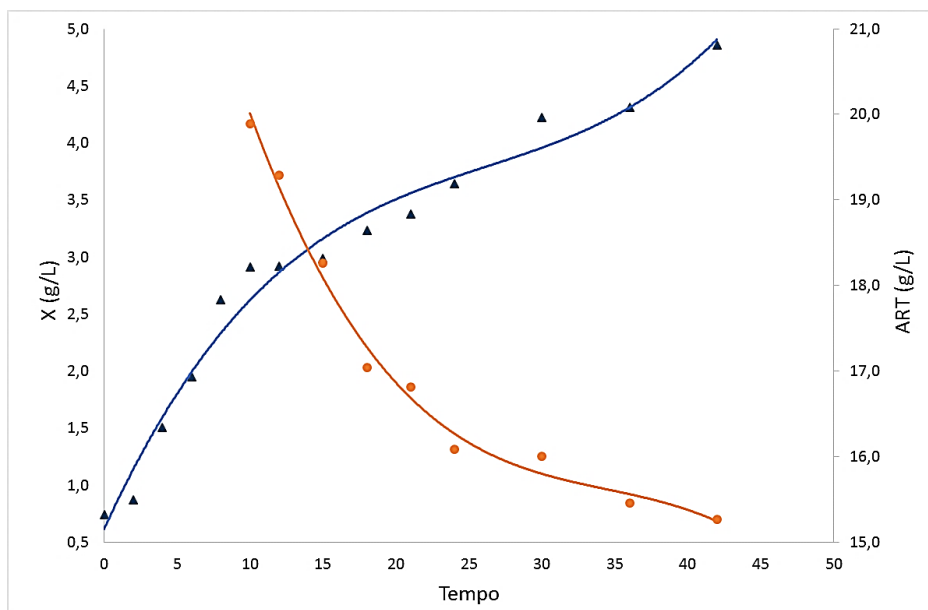


Figura 13 - Curva de concentração celular X (g/L) e consumo de ART em função do tempo para o ensaio 2. Fonte: próprio autor.

Em seus estudos, Silva (2018) realizou experimento fermentativo (Figura 13) em que o meio era composto apenas por solução de glicose a 20 g/L que apresentou fase *lag*, no intervalo de 0 a 2 horas de cultivo, atingindo crescimento celular de 7,96 g/L. Após 30 horas de cultivo, ocorreu decréscimo na concentração celular, atingindo 6,55 g/L, podendo ser observada fase exponencial entre 4 e 21 h de fermentação. A velocidade específica máxima observada pelo autor foi de $0,0194 \text{ h}^{-1}$.

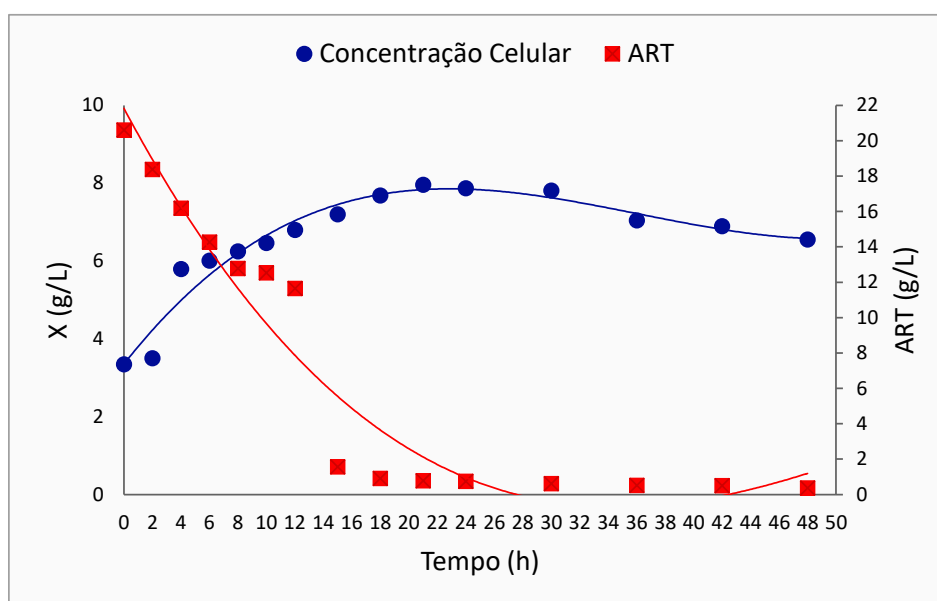


Figura 14 - Curva de concentração celular X (g/L) e consumo de ART em função do tempo para meio fermentativo composto apenas por glicose. Fonte: Silva (2018).

Apesar de as tendências observadas nos dois ensaios analisados serem próximas, no realizado por Silva (2018), o substrato constituído exclusivamente por glicose foi totalmente consumido em até 15 horas de cultivo, como pode ser visualizado na Figura 13. Por outro lado, para o ensaio realizado com hidrolisado de cacau, observou-se concentração de 16,8 g/L de ART em 48 horas de experimento. Tais fatos encontram-se em concordância com o observado por Lucero, Moreno e Lagunas (2012) e Volpe (1997) em que toda a glicose disponível no meio de cultivo foi consumida antes de outras fontes de carboidrato.

Bem como, o crescimento celular no ensaio 2 pode ter sido inibido pela presença de produtos secundários da hidrólise ácida. Segundo Rasmussen, Sørensen e Meyer (2014), dentre os compostos gerados pela degradação das hexoses os mais tóxicos aos micro-organismos são o furfural e o 5-hidroxi-metil-furfural em qualquer concentração, a influências desses é tão negativa que recomendam a remoção dos mesmos antes do utilizar hidrolisados em fermentação alcoólica.

Em relação ao teor de etanol em 48 horas de ensaio fermentativo, Silva (2018) obteve 21,5 °GL, em 48 h, enquanto para o ensaio 2 obteve-se 3,0 °GL, maior teor de etanol encontrado dentre todos os ensaios realizados no presente estudo em 24 horas. A diferença encontrada pode ser justificada devido à presença de inibidores no meio fermentativo quando foi utilizado hidrolisado de casca de cacau, em concordância com o observado por Silva (2018).

5 CONCLUSÃO

Ao avaliar a influência da concentração celular, observou-se que o ensaio 2, com menor concentração celular inicial de 0,74 g/L, obteve maior $\mu_{\text{máx}}$, $0,1671 \text{ h}^{-1}$. Portanto, concluiu-se que menor concentração celular inicial conduziu a uma maior taxa de crescimento celular.

Ao avaliar a influência da suplementação com glicose, observou-se que os ensaios 2 e 4 que receberam maiores concentrações de glicose em suas suplementações, 12,5 e 17,8 g/L, respectivamente, foram os que apresentaram queda mais evidente no consumo de açúcar disponível no meio de cultivo. Portanto, a levedura utilizada consumiu a glicose presente antes de quaisquer outras fontes de açúcar.

Em relação a produção de etanol, os ensaios iniciados com menores concentrações celulares foram o que obtiveram maiores teores de etanol, bem como, maiores valores de velocidade específica máxima de crescimento. O ensaio 2, iniciado a menor concentração celular de 0,74 g/L, obteve teor de etanol de 3,5 °GL em 24 horas, apresentando, também, a maior taxa de produção de etanol observada (0,15 g/L.h). Os ensaios 4 e 5, iniciados com concentração celular de 0,80 e 1,00 g/L, respectivamente, obtiveram teor de etanol de 5,8 e 4,3 °GL em 48 horas, respectivamente, e produtividade de etanol de 0,12 e 0,09 g/L.h, respectivamente. Assim, conclui-se que para alcançar alta produção de etanol deve ser considerado iniciar os cultivos com baixa concentração celular, uma faixa de açúcar que não iniba o crescimento, bem como, não haja presença de inibidores ou que sua presença seja minimizada.

Em função da escassez de publicações relacionadas ao aproveitamento de resíduo cacaueiro, os resultados indicam a possibilidade da utilização de material lignocelulósico proveniente do cacau para a produção de bioetanol, ratificando os resultados de Silva (2018).

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se como continuidade do presente trabalho:

- Realizar estudos com meio hidrolisado por via enzimática;
- Realizar estudos com leveduras que sejam mais tolerantes à presença de inibidores;
- Realizar estudos com leveduras imobilizadas a fim de verificar se a imobilização diminui o efeito da presença dos inibidores da etapa da fermentação alcoólica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS. **História do Cacau**. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/historia/>>. Acesso em 30 de maio de 2018.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13920: Determinação do teor alcoólico**. São Paulo: ABNT, 1997.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR, 2010.

AIPC – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE CACAU. **Câmara Setorial**, 2018. Publicado em 27/03/2018. Acesso em: 15 de julho de 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/cacau/2018/42a-ro/aipc-camara-setorial-marco2018.pdf>>.

ALMEIDA, J.R.M.; MODIG. T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. 'Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.340-349, 2007.

ALTHURI, A.; SRINIVAS, G.L.K.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, 2017. v.245, p. 530-539

ANTÔNIO, L. F. **Hidrólise ácida de polissacarídeos de microrganismos para produção de etanol**. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Ribeirão Preto, SP, 2010.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v.32, p. 1586-1595, 2009.

BANSAL, A.; LLLUKPITIYA, P.; SINGH, S.P.; TEGEGNE, F. Economic competitiveness of ethanol production from cellulosic feedstock in Tennessee. **Renewable Energy**, v.59, p.53-57, 2013.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25 p. 5-38, 2007.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-157, 1955.

BISPO, E. S.; FERREIRA, V.L.P.; SANTANA, L.R.R.; YOTSUYANAGI, K. Sensory profile and acceptance of alkalized cocoa (*Theobroma cacao* L.) powder. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 25, n. 2, p.375-381, 2005.

BITTENCOURT, M. Bahia registra em 2017 segunda pior produção de cacau da história. **Correio 24 horas**, 2017. Acesso em: 15 de julho de 2018. Disponível em:

<<https://www.correio24horas.com.br/noticia/nid/bahia-registra-em-2017-segunda-pior-producao-de-cacau-da-historia/>>.

BNDES - Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; CGEE. - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRASIL, Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal de Biocombustíveis**. Edição nº 106. Brasília - DF, 2017. Acesso em: 13 de abril de 2018. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138769/1732805/Boletim+DBio+n%C2%BA+106+dezembro+de+2016.pdf/d0fd7bc5-b800-443e-a0f6-2959e7dd8a8e>>.

BRASIL - AGÊNCIA DO SENADO LEGISLATIVO. Senado aprova política nacional de incentivo ao cacau de qualidade. **Senado notícias**, 2018. Publicado em: 07/08/2018. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2018/08/07/senado-aprova-politica-nacional-de-incentivo-ao-cacau-de-qualidade>. Acesso em: 30 de agosto de 2018.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

BRODEUR G., YAU E., BADAL K., COLLIER J., RAMACHANDRAN K.B., RAMAKRISHNAN S., Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-17, 2011.

CAMPO VIVO. **Conquista de produtor capixaba em concurso internacional de qualidade do cacau gera oportunidades**, 2018. Publicado em 26/03/2018. Disponível em: <<https://campovivo.com.br/fruticultura/amendoa-de-ouro-conquista-de-produtor-capixaba-em-concurso-internacional-de-qualidade-do-cacau-gera-oportunidades-para-o-setor/>> Acesso em 10 de outubro de 2018

CEPLAC - Comissão executiva do plano da lavoura cacaueira. **Características gerais do Cacau**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acesso em: 30 de maio de 2018.

CHENG, K. K.; ZHANG, J. A.; PING, W. X.; GE, J. P.; ZHOU, Y. J.; LING, H. Z.; XU, J. M. Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.151, n. 1, p. 43-50, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.3–23, 2005.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica**. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2015.

CTBE - CENTRO DE TECNOLOGIA DO BIOETANOL. **História do CTBE, laboratório referência em bioenergia**. 2010. Disponível em: <<http://ctbe.cnpem.br/octbe/historia-ctbe/>>. Acesso em 25 de maio de 2018.

CUENCA, M.A.G., NAZÁRIO, C.C. Importância econômica e evolução da cultura do Cacau no Brasil e na região dos tabuleiros costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. **Documentos 72- EMBRAPA**, Tabuleiros, Aracaju, 2004.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de Lipase Microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p. 81-87, 2010.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? , 2014. **FEMS Yeast Research**, v.14 (6), p.826-832.

DU, C.; ZHAO, X.; LIU D.; LIN, C.S.K.; WILSON, K.; LUQUE, R.; CLARK, J. Introduction: An overview of biofuels and production technologies. **Handbook of Biofuels Production**. 2ed, p.3-12, 2016.

DUSSAP, C.-G.; POUGHON, L. 10 - Microbiology of Alcoholic Fermentation. In: LEE, D.-J.; HALLENBECK, P.; NGO, H.; JEGATHEESAN, V.; PANDEY, A. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. 1 ed. Elsevier, 2017, p. 263-279.

FAN, S.; CHEN, S.; TANG, X.; XIAO, Z.; DENG, Q.; YAO, P.; SUN, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, C. Kinetic model of continuous ethanol fermentation in closed-circulating process with pervaporation membrane bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*, 2015. **Bioresource Technology**, v.177, p. 169-175.

FASANELLA, C.C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agroonomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 613 p, 1989.

FERNANDES-KLAJN, F.; ROMERO-GARCÍA, J.M.; DÍAZ, M.J.; CASTRO, E. Comparison of fermentation strategies for ethanol production from olive tree pruning biomass. **Industrial Crops and Products**, 2018. v. 122, p. 98-106.

GOMES, M. Produção nacional de cacau movimentou R\$ 14 bilhões por ano. **Correio Braziliense**, 2018. Publicado em: 19/03/2018. Acesso em: 30 de agosto de 2018. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/economia/2018/03/19/internas_economia,666957/producao-nacional-de-cacau-movimentou-r-14-bilhoes-por-ano.shtml>.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 225-231, 1985.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; MACEDO, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 23 - 33, 2015.

GURGEL, L. V. A., **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. 315 f. Tese (Doutorado em Ciências – Físico-Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.

HART, D. Fermenting Solutions to New World Problems: Bioremediation of Blue Agave and Cocoa Pod Wastes. 2017. **Theses and Dissertations. 806.** Disponível em: <<https://ir.library.illinoisstate.edu/etd/806>> Acesso em: 20 de maio de 2018

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Ev Wageningen, v.100, n.1, p.10-18, 2009.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola - LSPA.** Rio de Janeiro. v. 30, n. 9, p. 83, 2017. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201712.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201712.pdf)>. Acesso em: 17 de julho de 2018.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and Thermotolerance in the Bioconversion of Xylose by Yeasts. **Advances in applied microbiology**. v. 47, p. 221-268, 2000.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (2001). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** V.3, 1º ed. Editora: Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

LOPES, A. C. **Produção de álcool de batata-doce em função do meio fermentativo.** 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2013.

LUCERO, P.; MORENO, E.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 307-314, 2002.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista de Política Agrícola**, v. 15, n. 3, p. 64-78, 2006.

MALHERBE, S.; CLOETE, T.E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. **Environmental Science and Biotechnology**, v.1, p.105-114, 2002.

MEDEIROS, L.L.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; MADRUGA, M.S; MELO, D.J.N.; CONRADO, L.S. Bioconversion of hydrolyzed cashew peduncle bagasse for ethanol and xylitol production. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**. Campina Grande, v. 21, p. 488-492, 2017.

MERCADO DO CACAU. **Maiores produtores de cacau do país enfrentam momentos opostos na safra**, 2017. Publicado em 22/05/2017. Disponível em: <<http://mercadodocacau.com/artigo/maiores-produtores-de-cacau-do-pais-enfrentam-momentos-opostos-na-safra>> Acesso em 05 de outubro de 2018.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy and Fuels**, v.20, n.3, p.848-889, 2006.

MORORÓ, R. C. Aproveitamento dos derivados do cacau, subprodutos e resíduos do Cacau. In: Raul René Valle. (Org.). **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. 1ed. Itabuna, 2. Ed, p. 204-260, 2012.

NAJAFPOUR, G. D. Application of Fermentation Processes. In: **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2 ed. Elsevier, 2015, p. 329-344.

NELSON. D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6. Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.

OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010

OLIVEIRA Jr., A. R.; COSTA, A. M. **Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica**. Superintendência da Zona Franca de Manaus, Suframa. v.3 – Cacau. Manaus, 2003.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil**. 2005. CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, Ilhéus, 2005. 132p. Acesso em 20 de outubro de 2018. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/Agrotropica/avulsos/livrofito.pdf>>

OLIVEIRA, R.A.F. **A geração de energia elétrica através do uso de biomassa na Bahia: condicionantes e oportunidades**. 2006. 211f. Dissertação (Mestrado em Regulação da Indústria de Energia) - Universidade Salvador, Salvador, 2006.

ONU. **Smarter use of natural resources can inject \$2 trillion into global economy by 2050 – UN**. Publicado em: 17/03/2017. Acesso em: 29 de julho 2018. Disponível em: <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=56369#.WQs9T_nyuM_>.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de característica floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, SP, 2010.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresouce Technology**., 74, 25-33, 2000.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA'ANNA, L.M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v.2, 47 p, 2008.

PEREIRA, S. C. L. **Estudo comparativo de álcool utilizando a *Cyperus esculentus* via rota enzimática e ácida**. 2014. 101f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2014.

PETROBRAS. **Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico - FISPQ**. Publicado em: 09/04/2018. Acesso em 15 de agosto de 2018. Disponível em: <

PITARELO, A. P.; SILVA, T.A.; ZAMORA, P.G.P.; RAMOS, L.P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p.1502-1509, 2012.

PRIEUR, B.; MEUB, M.; WITTEMANN, M.; KLEIN, R.; BELLAYER, S.; FONTAINE, G.; BOURBIGOT, S. Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. **Royal Society of Chemistry Advances**. Issue 27, 2017.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

RABELO, S.; FILHO, R.; COSTA, A. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n.1-3, p. 45-58, 2008.

RABELO, S.C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Production of bioethanol. Methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v.102, p.7887-7895, 2011.

RAHAYU, F.; KAWAI, Y.; IWASAKI, Y.; YOSHIDA, K.; KITA, A.; TAJIMA, T.; KATO, J.; MURAKAMI, K.; HOSHINO, T.; NAKASHIMADA, Y. Thermophilic ethanol fermentation from lignocellulose hydrolysate by genetically engineered *Moorella thermoacetica*. **Bioresource Technology**, 2017. v.245, p. 1393-1399.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H.R.; MEYER, A.S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, n. 385, 2014. 45-57.

ROCHA, E. G. A. **Síntese, caracterização, uso e reciclo de líquidos iônicos próticos no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração**. 2016. 158f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v.37, p.19-27, 2012.

SILVA, J. S. **Produção de álcool na fazenda e em sistema cooperativo**. Viçosa, MG, 2007.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, R. de O. **Estudo do reaproveitamento dos resíduos sólidos da indústria cacaujeira**, 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

SILVA NETO, P. J.; MATOS, P.G.G.; MARTINS, A.C.S; SILVA, A.P. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, CEPLAC, 2001.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488-493, 2013.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n.4, p. 315-330, 2004.

VALLANDER, L.; ERIKSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnology and bioengineering**, v.27, n.5, p.650-659, 1985.

VASCONCELOS, N. M., PINTO, G.A.S., ARAGÃO, F.A.S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, n. 88, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE, 2013.

VOLPE, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 528-534, 1997.

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion, 2016. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.55.

WALKER, G.M.; WALKER, R.S.K. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, 2018.

WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J. M.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.

YU, Q.; CHEN, L. WANG, W.; WANG, Q; BAI, R.; ZHUANG, X.; GUO, Y.; QI, W.; YUAN, Z. Impact of blending on hydrolysis and ethanol fermentation of garden wastes. **Journal of Cleaner Production**, 2018. v.190, p. 36-43.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A - Construção da curva de calibração para determinação de ART pelo método DNS.

Com o intuito de construir curva padrão de calibração para o método DNS, primeiramente, preparou-se solução-padrão de glicose ao pesar 1,0 g de glicose anidra e transferir para balão volumétrico de 1,0 L, aferindo-se com água deionizada. A partir da solução-padrão de glicose com concentração de 1,0 g/L foram preparadas soluções com concentrações variando de 0,2 a 0,8 g/L de glicose.

Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL de cada solução para tubos de ensaio. Adicionou-se 1,0 mL de solução DNS em cada tubo de ensaio, que foram encaminhados para banho à quente a 100 °C por 5 minutos. Interrompeu-se a reação ao transferir os tubos para banho a frio. Cada amostra foi diluída para 15 mL com água deionizada. Após homogeneização, foram feitas leituras de absorbância a 540 nm, em duplicata. Para calibração do equipamento, utilizou-se de amostra denominada “branco” em que foi substituída solução de glicose por água deionizada.

Tabela 1 - Absorbância das concentrações de glicose após reação com DNS.

Concentração (g/L)	Absorbância (média)
0,2	0,1060
0,4	0,1985
0,6	0,2980
0,8	0,4195
1,0	0,4765

Fonte: próprio autor.

Os dados da Tabela 1 foram utilizados para a construção do gráfico da curva de calibração, apresentado na Figura 1.

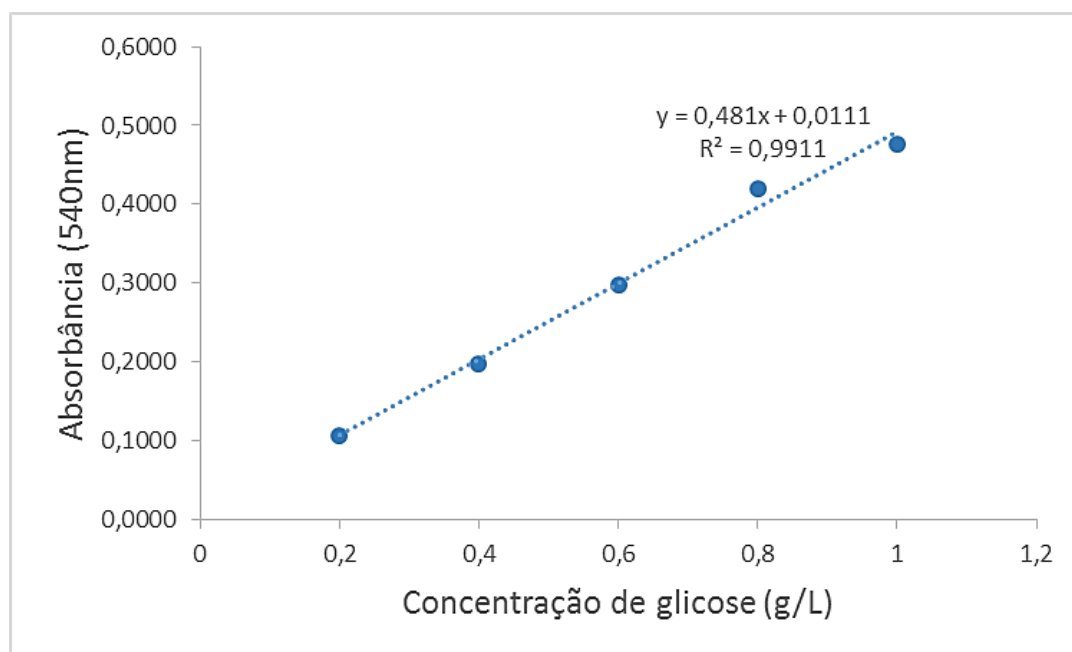


Figura 1 - Curva de calibração para determinar as concentrações de ART após reação com DNS.

Fonte: próprio autor.

Para calcular a concentração dos açúcares redutores totais (ART), em g.L^{-1} , utiliza-se a Equação 1, em que *abs* é a média das absorbâncias lidas, *f* é o fator de concentração e *d* é o inverso da diluição da amostra.

$$ART = abs . f . d \quad (1)$$

APÊNDICE B - Construção da curva de calibração para determinação de concentração celular.

A fim de construir curva de calibração para determinar a concentração celular ao longo dos ensaios de fermentação, diluiu-se 0,05 g de fermento biológico em um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, diluíram-se alíquotas de 2, 4, 6 e 8 mL dessa solução em balões de 10 mL com o intuito de que fossem feitas leituras de absorbância, em duplicata, para cada solução em espectrofotômetro (Kasuaki IL-227), no comprimento de onda de 570 nm.

Tabela 2 - Absorbância das concentrações celulares.

Concentração (g/L)	Absorbância (média)
0,2	0,332
0,4	0,559
0,6	0,818
0,8	1,123

Fonte: próprio autor.

Os dados da Tabela 2 foram utilizados para a construção do gráfico da curva de calibração, apresentado na Figura 2.

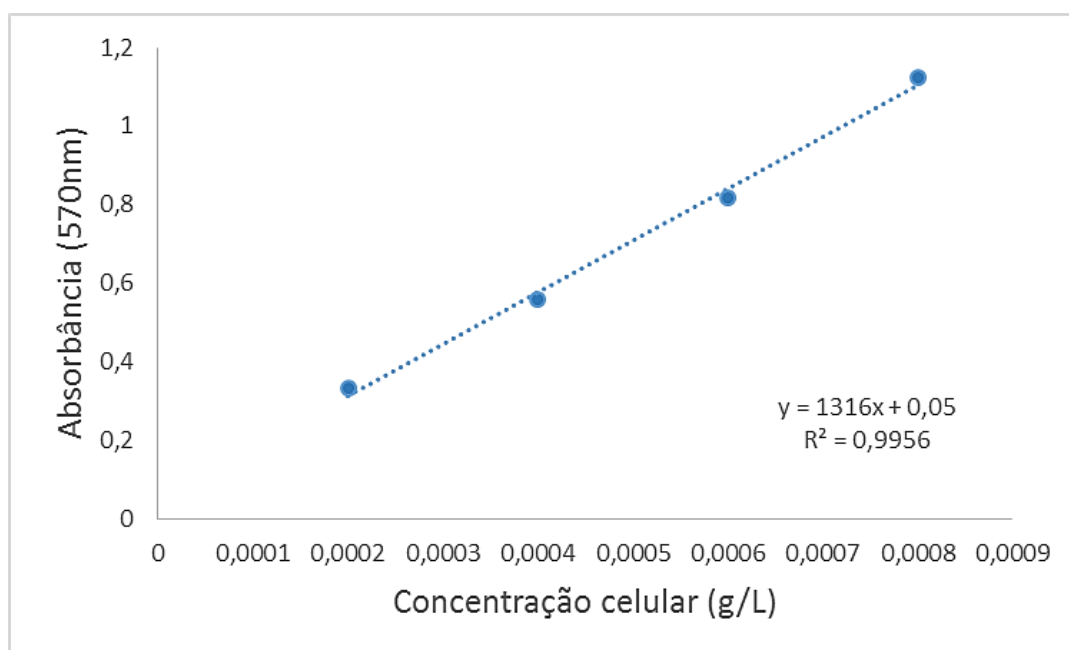


Figura 2 - Curva de calibração para determinar as concentrações celulares. Fonte: próprio autor.

APÊNDICE C - Construção de curva de calibração para determinação de etanol pelo método do dicromato de potássio.

Com o intuito de determinar a concentração de etanol produzido em cada destilado foi construída curva de calibração, pelo método do dicromato de potássio. Desse modo, fez-se necessária uma solução padrão de etanol que é diluída em diferentes proporções. Tal solução foi preparada com 0,190 mL de etanol absoluto em um balão volumétrico de 50 mL, aferido com água deionizada. Para preparar a solução de dicromato de potássio a ser utilizada: pesou-se 10,0 g do composto, diluindo-os em água deionizada; transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e ajustou-se o volume com água deionizada.

Na Tabela 3 estão listadas as soluções preparadas em cada tubo de ensaio.

Tabela 3 - Soluções para construção de curva de calibração.

Solução	Solução padrão (mL)	Água deionizada (mL)	Etanol correspondente
1	1,0	4,0	3,0mg
2	2,0	3,0	6,0 mg
3	3,0	2,0	9,0 mg
4	4,0	1,0	12,0 mg
Branco	-	5,0	0,0 mg

Fonte: próprio autor.

Por conseguinte, foi adicionado em cada tubo de ensaio, lentamente, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após um minuto, adicionou-se 1,0 mL de solução de dicromato de potássio 10% (m/v) previamente preparada. Os tubos foram tampados, agitados e resfriados a temperatura ambiente. Isto posto, transferiu-se cada solução para cubeta de quartzo de 1 cm³ a fim de que fossem feitas leituras em duplicata de absorbância em espectrofotômetro (Kasuaki IL-227), no comprimento de onda de 600 nm. Para zerar o espectrofotômetro, foi preparada uma amostra denominada branco, em que o destilado do cacau foi substituído por água deionizada. A partir das médias das absorbâncias lidas, construiu-se a curva de calibração. Na Tabela 4 é possível observar a média das absorbâncias lidas, bem como as respectivas concentrações de etanol em cada solução, em mg.

Tabela 4 - Absorbâncias em determinadas concentrações de etanol.

Concentração de etanol (mg)	Absorbância (média)
3	0,3135
6	0,5625
9	0,8560
12	1,0710

Fonte: próprio autor.

A partir dos dados supracitados construiu-se curva de calibração que pode ser contemplada na Figura 3.

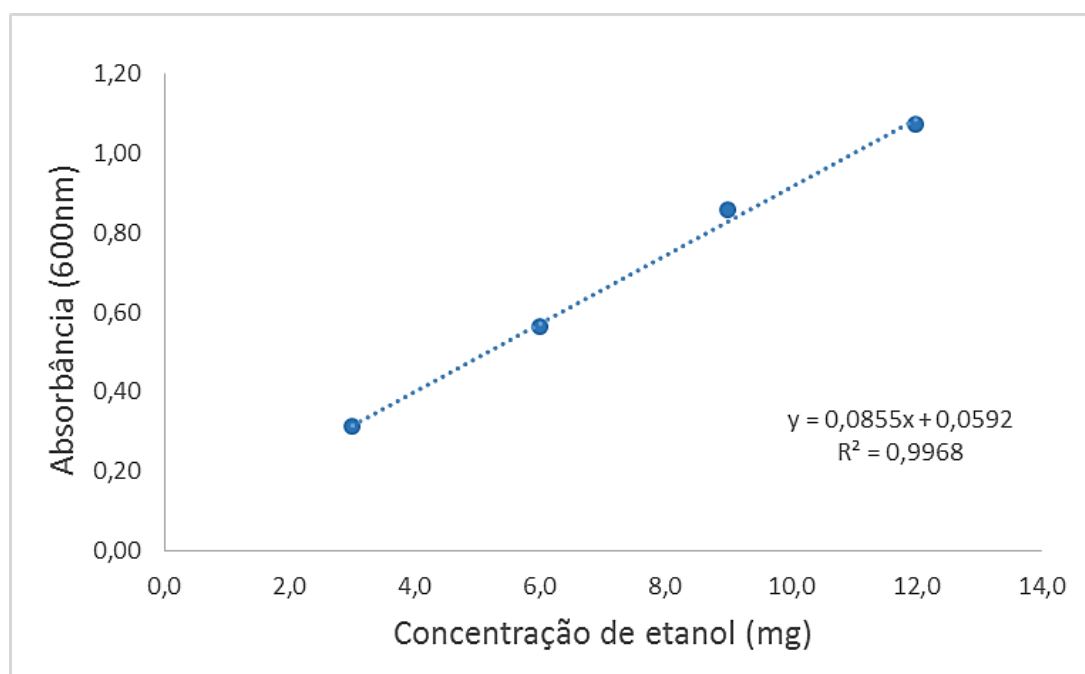


Figura 3 - Curva de calibração de etanol. Fonte: próprio autor.

O teor alcoólico das amostras, em °GL, foi calculado pela Equação 2 em que os coeficientes utilizados foram obtidos da curva apresentada na Figura 3. O teor de etanol na amostra ($Teor_{etanol}$) é dado em mL/100 mL (°GL). Deve ser considerada a densidade do etanol a 20 °C ($0,7834 \text{ g.mL}^{-1}$) e os fatores de conversão de mg para g (1000) e da alíquota de 0,020 mL para 100 mL (5000).

$$Teor_{etanol} = \frac{(Abs_{média} - Coef_{linear})}{Coef_{angular}} \cdot \frac{5000}{0,7834 \cdot 1000} \quad (2)$$

APÊNDICE D - Tabelas dos resultados de ART e concentração celular dos ensaios fermentativos.

A fim de facilitar a leitura dos resultados de ART e concentração celular, é apresentada tabela com resumo das condições experimentais propostas (Tabela 5). Nas tabelas 6 a 10 encontram-se os resultados para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Resumo das condições experimentais adotadas nos ensaios de fermentação.

Ensaio fermentativo	Concentração celular inicial desejada (g/L)	Suplementação de glicose (g/L)
1	3,0	12,50
2	1,0	12,50
3	5,0	12,50
4	1,6	17,80
5	1,6	7,20

Fonte: próprio autor.

Tabela 6 - Concentrações celulares e ART no decorrer da fermentação alcoólica do ensaio 01.

Experimento	Tempo (h)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	0	1,88	20,30
2	2	1,70	13,54
3	4	1,87	13,45
4	6	2,09	13,15
5	8	1,90	12,43
6	10	1,95	13,01
7	12	2,29	12,53
8	15	2,30	11,68
9	18	2,82	12,27
10	21	2,15	11,40
11	24	2,51	11,94
12	30	2,01	11,53
13	36	2,35	11,61
14	42	2,47	11,36
15	48	2,27	10,65

Fonte: próprio autor.

Tabela 7 - Concentrações celulares e ART no decorrer da fermentação alcoólica do ensaio 02.

Experimento	Tempo (h)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	0	0,74	79,81
2	2	0,87	74,60
3	4	1,50	58,64
4	6	1,95	44,59
5	8	2,62	21,90
6	10	2,91	19,89
7	12	2,92	19,29
8	15	2,99	18,26
9	18	3,23	17,04
10	21	3,38	16,82
11	24	3,64	16,09
12	30	4,22	16,01
13	36	4,31	15,46
14	42	4,85	15,26
15	48	3,24	16,76

Fonte: próprio autor.

Tabela 8 - Concentrações celulares e ART no decorrer da fermentação alcoólica do ensaio 03.

Experimento	Tempo (h)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	0	2,48	34,89
2	2	2,62	16,71
3	4	2,70	16,19
4	6	2,57	16,88
5	8	2,63	16,78
6	10	2,63	14,25
7	12	2,53	14,98
8	15	2,91	13,58
9	18	2,93	12,76
10	21	2,81	14,84
11	24	2,86	14,62
12	30	2,78	14,59
13	36	3,02	13,60
14	42	2,94	13,33
15	48	3,39	12,32

Fonte: próprio autor.

Tabela 9 - Concentrações celulares e ART no decorrer da fermentação alcoólica do ensaio 04.

Experimento	Tempo (h)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	0	0,80	39,88
2	2	1,19	26,16
3	4	2,12	16,39
4	6	2,06	14,63
5	8	2,12	14,04
6	10	2,29	13,83
7	12	2,32	12,90
8	15	2,47	12,94
9	18	2,75	12,53
10	21	2,90	12,72
11	24	3,20	12,61
12	30	3,51	12,46
13	36	3,73	12,71
14	42	4,33	12,81
15	48	5,28	12,92

Fonte: próprio autor.

Tabela 10 - Concentrações celulares e ART no decorrer da fermentação alcoólica do ensaio 05.

Experimento	Tempo (h)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	0	1,00	43,11
2	2	1,35	35,18
3	4	2,07	18,73
4	6	2,29	15,23
5	8	2,22	15,33
6	10	2,68	14,63
7	12	3,20	14,29
8	15	2,95	13,83
9	18	3,35	13,75
10	21	3,61	13,56
11	24	3,09	13,47
12	30	3,66	13,63
13	36	4,86	13,27
14	42	4,82	13,02
15	48	5,03	12,46

Fonte: próprio autor.

APÊNDICE E - Velocidade específica máxima.

Dadas as curvas de crescimento celular em cada ensaio fermentativo foi possível obter valores de velocidade específica máximas de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* ($\mu_{\text{máx}}$). Portanto, foram traçadas retas ajustadas utilizando o método dos mínimos quadrados por meio de regressão linear na fase exponencial do crescimento apresentado. A velocidade específica máxima de cada ensaio corresponde à inclinação da reta traçada a partir do $\ln(x)$ da concentração celular observada para os ensaios 1, 2, 3, 4 e 5 ao longo do tempo, como pode ser observado nas Figuras 4, 5, 6, 7, e 8.

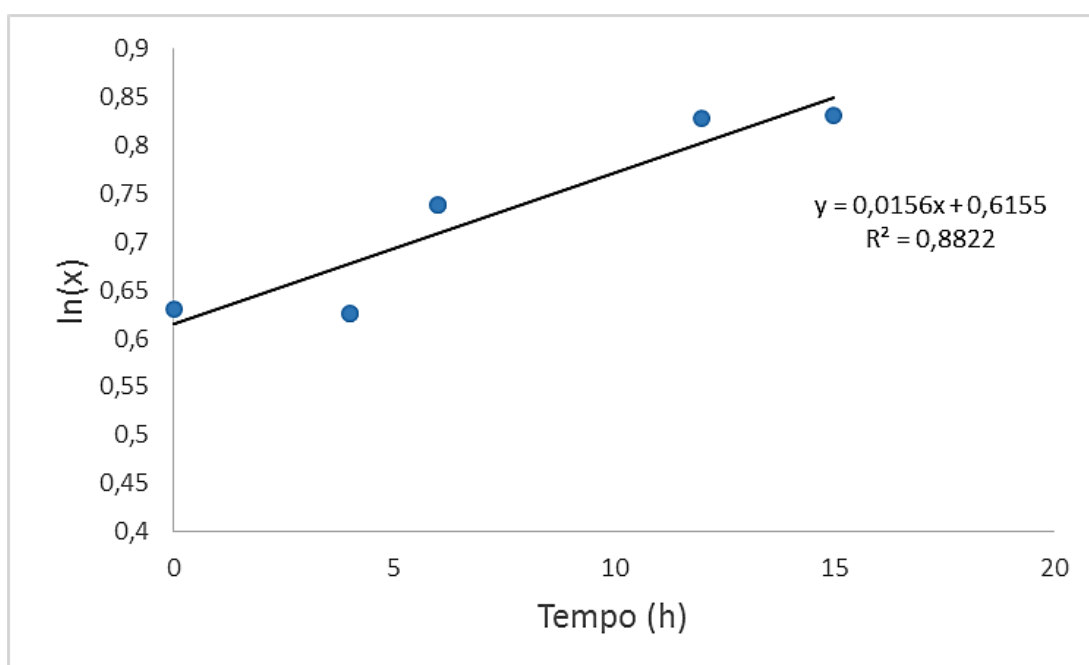


Figura 4 - $\ln(x)$ versus tempo do ensaio 1. Fonte: próprio autor.

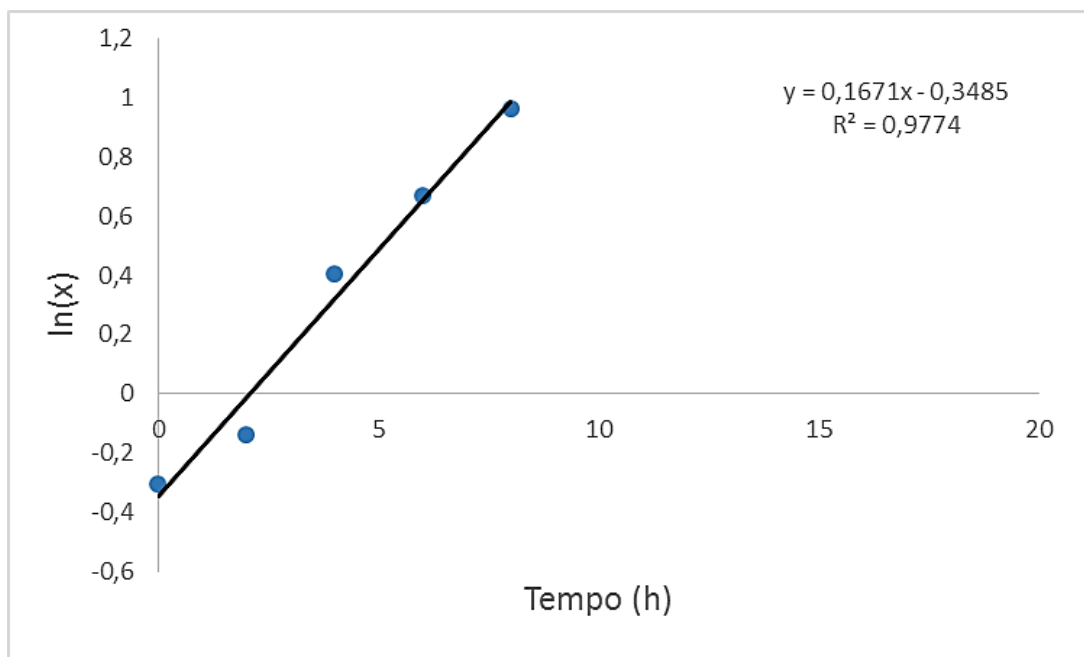


Figura 5 - $\ln(x)$ versus tempo do ensaio 2. Fonte: próprio autor.

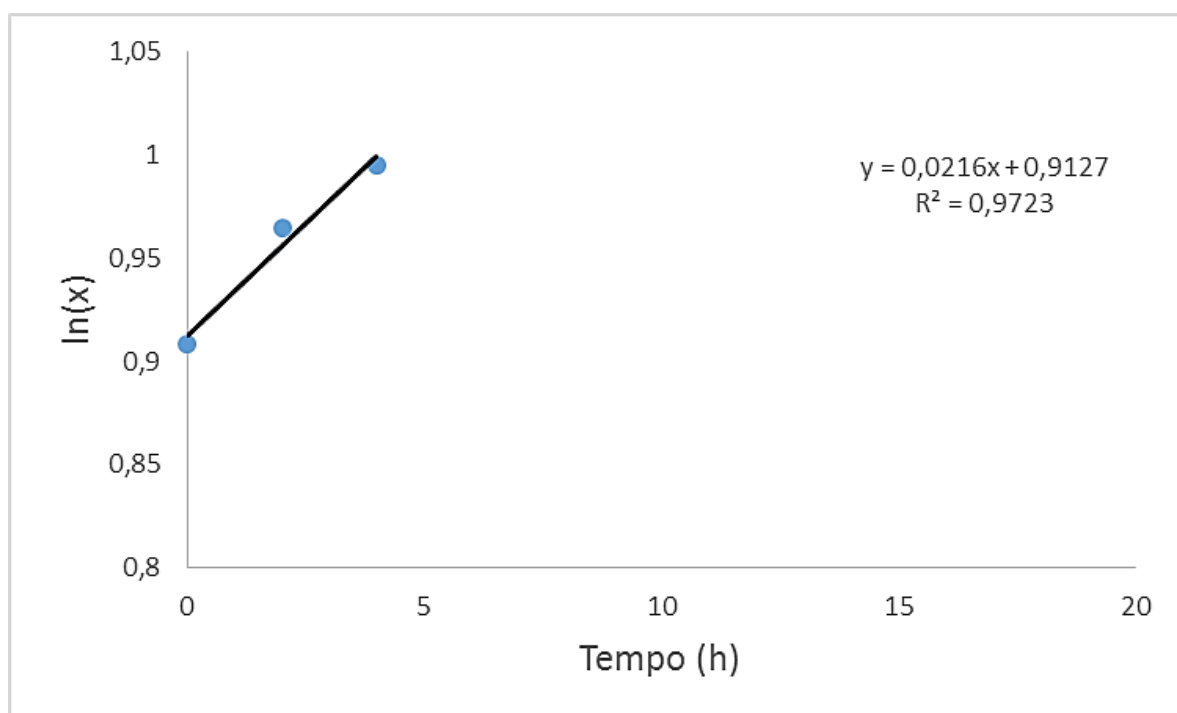


Figura 6 - $\ln(x)$ versus tempo do ensaio 3. Fonte: próprio autor.

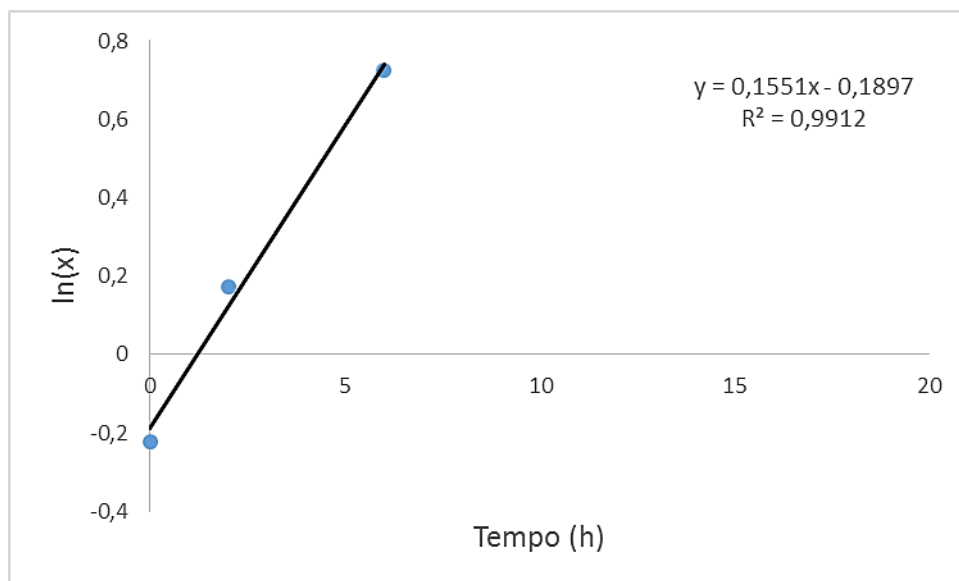


Figura 7 - $\ln(x)$ versus tempo do ensaio 4. Fonte: próprio autor.

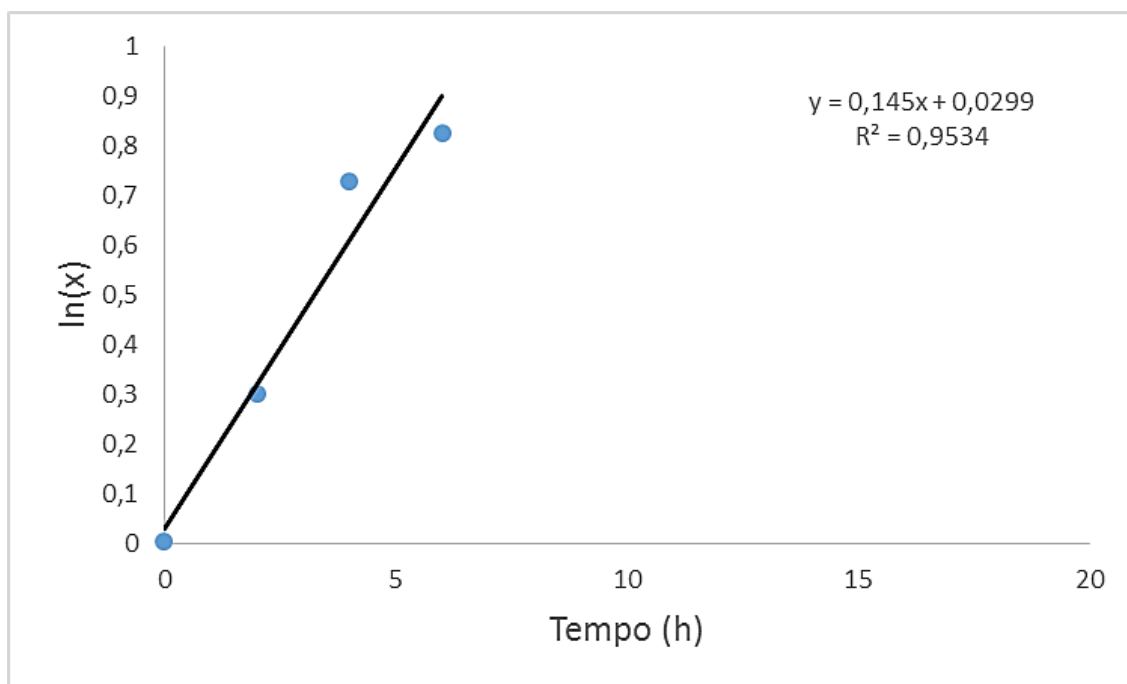


Figura 8 - $\ln(x)$ versus tempo do ensaio 5. Fonte: próprio autor.